

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ

**Μετάδοση του μη έμμου ιού Υ της πατάτας  
(PVY<sup>N</sup>) με πτερωτές αφίδες *Myzus persicae*  
(Hemiptera: Aphididae)**



**ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ Γ. ΑΡΓΥΡΗ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΒΟΛΟΣ, 2005**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4874/1  
Ημερ. Εισ.: 10-08-2006  
Δωρεά: Συγγραφέα  
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ – ΦΠΑΠ  
2005  
ΑΡΓ

ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΟΥ ΜΗ ΕΜΜΟΝΟΥ ΙΟΥ Υ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ (PVY<sup>N</sup>)  
ΜΕ ΠΤΕΡΩΤΕΣ ΑΦΙΔΕΣ *MYZUS PERSICAE*  
(HEMIPTERA: ARHIDIDAE)

## Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Ι. Τσιτσιπής

Καθηγητής  
Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας  
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ν. Παπαδόπουλος

Επίκουρος καθηγητής  
Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας  
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ε. Βέλλιος

Λέκτορας  
Φυτοπαθολογίας  
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της πτυχιακής διατριβής μου θα ήθελα να ευχαριστήσω αυτούς που με βοήθησαν και με στήριξαν σε αυτή μου την προσπάθεια.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον κ. Ι. Α. Τσιτσιπή Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της παρούσας διατριβής και την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στον Δρ. Ι. Μαργαριτόπουλο για τη βοήθειά του κατά τη διεκπεραίωση του πειράματος αλλά και κατά τη συγγραφή της διατριβής. Ευχαριστίες εκφράζονται και στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια Καναβάκη Ολυμπία με την οποία συνεργαστήκαμε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Ευχαριστίες εκφράζονται και στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Ν. Παπαδόπουλο, επίκουρο καθηγητή Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας και κ. Ε. Βέλλιο, Λέκτορα Φυτοπαθολογίας, για τις υποδείξεις και διορθώσεις της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστίες εκφράζονται στον κ. Ν. Ι. Κατή, Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος καθώς και στο Καπνολογικό Ινστιτούτο για τη διάθεση του σπόρου καπνού που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου, την οικογένειά μου που στήριξε οικονομικά και ηθικά τις προσπάθειές μου, όλα αυτά τα χρόνια.

*Το παρόν αφιερώνεται στον πατέρα μου,  
Γεώργιο, στον αδερφό μου, Δημήτρη  
και στην μνήμη της μητέρας μου, Ευτυχίας.*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	6
Περίληψη .....	7
ABSTRACT.....	9
Σκοπός .....	11
1. Εισαγωγή.....	12
1.1. Γενικά .....	12
1.2. Η αφίδα <i>Myzus persicae</i> (Sulzer).....	14
1.2.1. Ταξινόμική θέση.....	14
1.2.2. Μορφολογία ενήλικου .....	14
1.2.3. Ξενιστές .....	16
1.2.4. Βιολογία .....	17
1.2.5. Ζημιές .....	20
1.2.6. Καταπολέμηση.....	22
1.3. Ο ιός Υ της πατάτας ( <i>Potato virus Υ</i> ή PVY) .....	24
1.3.1. Χαρακτηριστικά.....	25
1.3.2. Φυλές.....	26
1.3.3. Γεωγραφική διανομή.....	27
1.3.4. Ξενιστές .....	27
1.3.5. Συμπτώματα .....	27
1.3.6. Μετάδοση .....	29
1.3.7. Ανίχνευση .....	33
1.3.8. Έλεγχος του PVY.....	33
1.4. Μετάδοση των φυτικών ιών με έντομα .....	36
1.4.1. Μετάδοση με αφίδες .....	37
1.5. Μηχανική μετάδοση των ιών .....	46
1.5.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μηχανική μετάδοση με χυμό .....	47
1.6. Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA.....	49
(Enzyme - Linked Immunosorbent Assay, ELISA) .....	49
1.6.1. Κατηγορίες άμεσης ELISA .....	50
1.6.2. Έμμεση ELISA (Indirect ELISA).....	54
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	56
1. Εισαγωγή.....	57
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	59
2.1. Ανάπτυξη φυτών καπνού .....	59
2.3. Συλλογή αφίδων .....	61
2.4. Διαδικασία μετάδοσης PVY από πτερωτά άτομα .....	62
3. Αποτελέσματα.....	64
4. Συζήτηση - Συμπεράσματα .....	67
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ .....	70
Βιβλιογραφία.....	75

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## Περίληψη

Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae), γνωστή και ως η πράσινη αφίδα της ροδακινιάς, είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος αφού προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών σε όλες τις ηπείρους. Εκτός από την αξιόλογη άμεση ζημιά την οποία προκαλεί, θεωρείται και ένας από τους πιο αποτελεσματικούς φορείς πολλών ιώσεων. Πραγματοποιώντας επιφανειακά νύγματα δοκιμασίας κυτταρικού χυμού διάρκειας λίγων δευτερολέπτων, μπορεί να μεταδώσει αποτελεσματικά πάνω από 100 φυτικούς ιούς, μεταξύ των οποίων και ο μη έμμενος ιός Y της πατάτας (*Potato virus Y*, PVY).

Στην παρούσα διατριβή, ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα μετάδοσης της νεκρωτικής φυλής του ιού Y της πατάτας (PVY<sup>N</sup>), από πτερωτά άτομα της αφίδας *M. persicae*, σε φυτά καπνού. Τα πτερωτά άτομα συλλέχθηκαν από ροδακινιές δύο διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών (Μελίκη του νομού Πιερίας και Βελεστίνο του νομού Μαγνησίας, αντίστοιχα). Μορφομετρικές και μοριακές μελέτες στον πληθυσμό της *M. persicae*, των δύο αυτών περιοχών, έδειξαν ότι, οι πληθυσμοί που προέρχονται από την Μελίκη, ανήκουν στο υποείδος *M. persicae nicotianae*, το οποίο παρουσιάζει εξειδίκευση στην επιλογή του ξενιστή και συγκεκριμένα αποικίζει τον καπνό *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae). Οι πληθυσμοί που προέρχονται από το Βελεστίνο, ανήκουν στο τάξο *M. persicae sensu stricto* (s. str.) το οποίο είναι πολυφάγο. Αποικίζει τον καπνό όσο και άλλους δευτερεύοντες ξενιστές.

Η μετάδοση του ιού πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο. Την πηγή μόλυνσης αποτέλεσαν φυτά καπνού, στα οποία διατηρήθηκε ο ιός με μηχανική μετάδοση. Ο χρόνος πρόσληψης και μετάδοσής του ήταν ελεγχόμενος. Συγκεκριμένα, ο χρόνος πρόσληψης του ιού από το μολυσμένο φυτό, ήταν τρία λεπτά, και ο χρόνος διατήρησης των αφίδων στα υγιή φυτά καπνού, ήταν επίσης τρία λεπτά για τον μισό περίπου πληθυσμό των πτερωτών και δέκα για τον υπόλοιπο.

Μετά την αφιδομετάδοση του ιού και το πέρας δεκαπέντε ημερών, τα φυτά καπνού εξετάστηκαν με την μέθοδο της ELISA για την ανίχνευση του PVY<sup>N</sup>. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και τα συμπεράσματα τα οποία διεξήχθησαν ήταν τα εξής: α) τα πτερωτά *M. persicae*

*nicotianae* και *M. persicae s. str.*, αναγνωρίζουν γρήγορα το φυτό – ξενιστή, λίγο μετά την προσγγείωσή τους σε αυτό, β) τα πτερωτά *M. persicae s. str.*, πραγματοποιούν λιγότερες διατρήσεις γιατί δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση στον καπνό, ωστόσο γ) και το εξειδικευμένο και το πολυφάγο είδος μεταδίδουν αποτελεσματικά την νεκρωτική φυλή του PVY και δ) ο χρόνος που τα πτερωτά είχαν διαθέσιμο για να πραγματοποιήσουν νύγματα δοκιμών στα υγιή φυτά και κατά συνέπεια να μεταδώσουν τον ιό, επηρέασε το ποσοστό μετάδοσης μόνο στις αφίδες του πολυφάγου είδους.

Αξίζει να επισημανθεί η σημασία της παρουσίας των πτερωτών *M. persicae nicotianae* και *M. persicae s. str.* σε μια περιοχή όπου καλλιεργείται καπνός. Η εξειδίκευση που παρουσιάζει το υποείδος *M. persicae nicotianae* στον καπνό, αλλά και η μη απόρριψή του ως ξενιστή από το *M. persicae s. str.*, έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη αύξηση του πληθυσμού των αφίδων. Το μεγάλο μέγεθος του πληθυσμού των αφίδων σε συνδυασμό με τη μεγάλη μολυσματική ικανότητα που παρουσιάζουν και τις ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες που ενδεχόμενα να επικρατήσουν, συμβάλουν στην εκδήλωση επιδημίας. Συνεπώς, η παραγωγή των καπνοφυτειών θα μειωθεί, τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά. Για τον περιορισμό των δυσμενών επιπτώσεων στην παραγωγή, απαιτείται η εφαρμογή των κατάλληλων τεχνικών και μεθόδων στον κατάλληλο χρόνο, ώστε να διατηρηθεί ο πληθυσμός των αφίδων κάτω από το επίπεδο οικονομικής ζημιάς.

## ABSTRACT

The aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae), known also as the green peach aphid, is an exceptionally polyphagous species since it affects more than 400 species of plants in all continents. Besides the serious damage it causes, it is regarded as one of the most effective vectors of many plant viruses. By making surface probes for testing the cellular sap, which last only some seconds, it can transmit efficiently more than 100 plant viruses, including the non-persistent *Potato virus Y* (PVY).

In the present study, we investigated the transmission efficiency of the necrotic isolate of *Potato Virus Y* alate aphids of *M. persicae* in tobacco plants. The aphids were collected from peach-trees in two different geographical areas: Meliki in Pieria prefecture, and Velestino in Magnesia prefecture. Morphometric and molecular studies of *M. persicae* populations coming from these two areas, have showed that the population coming from Meliki belongs to the subspecies *M. persicae nicotianae* which shows host specialisation. Specifically, it colonizes *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae). The population coming from Velestino belongs to the taxon *M. persicae sensu stricto* (*s.str.*) which is polyphagous. It colonizes not only tobacco but other herbaceous host plants as well.

The virus transmission was studied in the laboratory. Lufeastal tobacco plants were the source plants, on which the virus was retained by mechanical transmission. Acquisition and transmission periods were controlled. Specifically, the virus acquisition time from the infected plant was 3 minutes while aphid retention time on healthy tobacco plants was also three minutes for half the alate population and 10 minutes for the rest.

After the virus infection of the plants by the aphids and in 15 days, the tobacco plants were tested with ELISA to detect PVY<sup>N</sup>. The statistic analysis of the results showed that: a) the alate *M. persicae nicotianae* and *M. persicae s. str.*, identify the host plant as soon as they alight on it, b) alate *M. persicae s. str.*, make fewer penetrations because they do not have any specialisation in recognising tobacco plants, g) both the specialist and the polyphagous taxa transmitted the necrotic isolate of PVY efficiently, and d) the time the alatae have at their disposal to make test probes on healthy plants

and consequently to transmit the virus, affected the rate of the transmission only in the polyphagous taxon.

It is worth pointing out the importance of the presence of alate *M. persicae nicotianae* and *M. persicae s. str.* in an area where tobacco plants grow. The specialisation of the subspecies *M. persicae nicotianae* in tobacco plants and their acceptance on as host plants by *M. persicae s. str.*, result in a fast grow of aphid populations. The high number of aphids in combination with its high infectious ability and the favourable conditions of the environment which may prevail, contribute to epidemic outbreaks. Therefore, tobacco plantations will be reduced not only in quantity but also in quality. To reduce the adverse implications in production, it is necessary to apply special techniques and methods at a suitable time to keep aphid populations below the level of economic damage.



## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής, είναι ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας μετάδοσης ενός στελέχους της νεκρωτικής φυλής του μη έμμου ιού PVY από πτερωτά άτομα του *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae).

Συγκεκριμένα, έγινε μια προσπάθεια εκτίμησης του ποσοστού μετάδοσης του ιού και της ύπαρξης ή όχι διαφοράς, μεταξύ του εξειδικευμένου στον καπνό τάξο *M. persicae nicotianae* και του πολυφάγου *M. persicae sensu stricto*. Διερευνήθηκε δηλαδή, η συμβολή των πτερωτών στην εξάπλωση του ιού Y της πατάτας και αυτό γιατί η γνώση της μολυσματικής ικανότητας των φορέων, καθιστά δυνατό τον έγκαιρο και αποτελεσματικό έλεγχο του ιού.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο, υπό ελεγχόμενο χρόνο πρόσληψης και μετάδοσης του ιού. Η πρόσληψη και η μετάδοση του PVY έγινε από και σε φυτά καπνού.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Γενικά

Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae), γνωστή και ως η πράσινη αφίδα της ροδακινιάς, ανήκει στην υπεροικογένεια Aphidoidea, της τάξης Hemiptera. Είναι ένα μικρόσωμο έντομο, με μαλακό σώμα. Είναι εξαιρετικά πολυφάγο και προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών. Προτιμά κυρίως τους τρυφερούς βλαστούς και τα τρυφερά φύλλα των φυτών, όπου δημιουργεί αποικίες (van Emdem *et al.* 1969, Blackman & Eastop 1984).

Τρέφεται μζώντας χυμό από τα φυτά και προκαλεί συστροφή των φύλλων. Τα άφθονα μελιτώδη απεκκρίματά του, ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς και ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων καπνιάς. Εκτός απ' την αξιολογή άμεση ζημιά την οποία προκαλεί στα φυτά, θεωρείται και ένας από τους πιο αποτελεσματικούς φορείς πολλών ιών (Kennedy *et al.* 1962).

Ο ιός Υ ή ιός ράβδωσης της πατάτας (*Potato virus Y*, PVY) είναι ένας από τους 100 περίπου ιούς φυτών που μπορούν να μεταδοθούν με την *M. persicae*. Αναφορές στη βιβλιογραφία καταδεικνύουν το είδος *M. persicae* ως τον πιο αποτελεσματικό φορέα του ιού, ακολουθούμενο από το είδος *Aphis gossypii* (Glover) και το *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera, Aphididae) (Walsh *et al.* 2000).

Ο PVY ανήκει στην οικογένεια *Potyviriidae*. Έχει όλες τις γενετικές πληροφορίες που χρειάζεται για να αναπαράγει τον εαυτό του, ωστόσο η αναπαραγωγή του προϋποθέτει την είσοδό του σε κάποιο κύτταρο ξενιστή. Το κύτταρο του παρέχει τα αναγκαία ένζυμα καθώς και την ενέργεια που χρειάζεται για να πολλαπλασιαστεί.

Μεταδίδεται με μηχανικό τρόπο και εμβολιασμό, ενώ σε συνθήκες αγρού μεταδίδεται κυρίως με τις αφίδες κατά μη έμμοιο τρόπο. Ο PVY προσλαμβάνεται κυρίως με τις αφίδες – φορείς κατά τη διάρκεια μικρών και επιφανειακών νυγμάτων δοκιμασίας διάρκειας λίγων δευτερολέπτων και μπορεί να μεταδοθεί αμέσως μετά την πρόσληψη χωρίς να απαιτείται χρόνος επώασης (Κατής 2000).

Είναι ευρέως διαδεδομένος και πολύ σημαντικός ιός των φυτών. Τα συμπτώματα που προκαλεί ποικίλουν κατά πολύ ανάμεσα στα καλλιεργητικά είδη και ποικιλίες των φυτών και τις φυλές του ιού (Buchen & Osmond 1987).

Για την αντιμετώπισή του απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ανίχνευση της παρουσίας του στα φυτά. Ο PVY μπορεί να ανιχνευτεί με την Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) με την οποία μπορούν επίσης να διαχωριστούν και οι φυλές του. Ευρεία εφαρμογή στην ανίχνευση του ιού Y της πατάτας, έχει και η ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA.

Στην ELISA χρησιμοποιείται αντιορός με αντισώματα που αναγνωρίζουν τον συγκεκριμένο ιό (αντιγόνο). Ανιχνεύοντας τη σύνδεση του αντισώματος και του ομόλογου αντιγόνου, συμπεραίνεται η ύπαρξη του ιού στο φυτικό δείγμα (Walsh *et al.* 2000).

## 1.2. Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer)

### 1.2.1. Ταξινόμική θέση

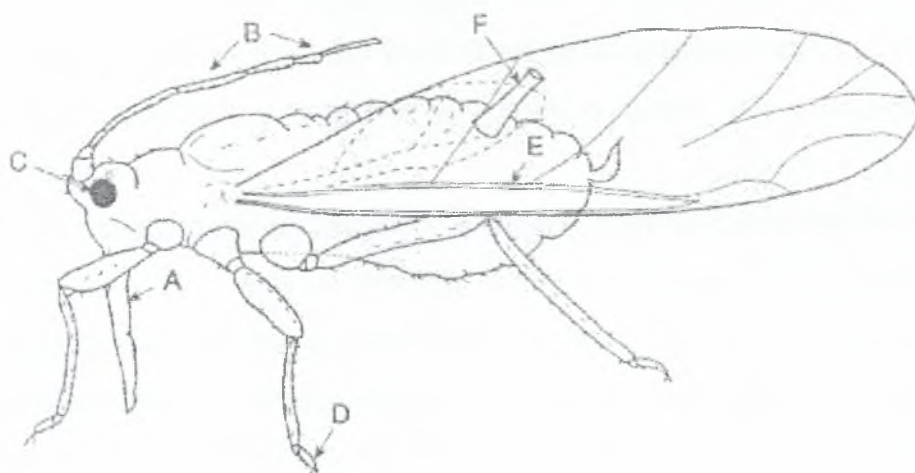
Το είδος *Myzus persicae* (Sulzer) ανήκει στο Ζωικό Βασίλειο, στην κλάση: Insecta, υπόκλαση: Εξωπτερυγωτά, ταξη: Hemiptera, υπεροικογένεια: Aphidoidea, οικογένεια: Aphididae. Υπάρχουν περισσότερα από 30 συνώνυμα ονόματα του είδους ενώ το κοινό όνομα του *M. persicae* είναι πράσινη αφίδα της ροδακινιάς. Στον αγρότη και στο μέσο άνθρωπο, είναι γνωστή με τα κοινά ονόματα, μελίγκρα, ψύλλος, ψείρα.

### 1.2.2. Μορφολογία ενήλικου

Οι αφίδες του *M. persicae* (Hemiptera, Aphididae) είναι μικρού μεγέθους έντομα (1,2 και 2,3 mm το μήκος των άπτερων και πτερωτών θηλυκών, αντίστοιχα), με μαλακό σώμα, σχήματος ωοειδές και πεπλατυσμένο. Το κεφάλι, ο θώρακας και η κοιλία, τις περισσότερες φορές είναι ευδιάκριτα με γυμνό οφθαλμό. Έχουν λεπτά πόδια, αρθρωτούς ταρσούς και κεραίες που αποτελούνται από 3 – 6 άρθρα. Στα νώτα του 5ου κοιλιακού δακτυλίου η *M. persicae* έχει ένα ζεύγος σωληνόμορφων αποφύσεων που λέγονται σίφωνες ή κεράτια και στην άκρη της κοιλιάς μια απόφυση που λέγεται ουρίτσα ή ουρά (cauda). Η ουρίτσα είναι στενόμακρη, μήκους 0,2 mm και με τρία ζεύγη τριχών. Οι σίφωνες είναι λεπτοί και μακριοί, μήκους 0,4 mm αλλά δεν ξεπερνούν την άκρη της ουρίτσας. Είναι οι εκφορητικοί αγωγοί αδένων που παράγουν φερομόνες συναγερμού. Όταν η αφίδα προσβληθεί από ένα αρπακτικό έντομο ή άλλο ζώο, εκλύει τις κηρώδους φύσεως φερομόνες, που προκαλούν διασπορά των γύρω της αφίδων. Στην κεφαλή υπάρχει ένα μακρύ ρύγχος, η βάση το οποίου βρίσκεται ανάμεσα στα πρόσθια ισχία. Σε ότι αφορά το χρωματισμό, υπάρχει μια διαφοροποίηση ανάμεσα στα άτομα της *M. persicae*. Συγκεκριμένα, τα άπτερα άτομα έχουν σχεδόν ομοιόμορφο χρώμα με διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του κόκκινου. Τα πτερωτά έχουν πράσινο χρώμα και φέρουν μια σκουρόχρωμη

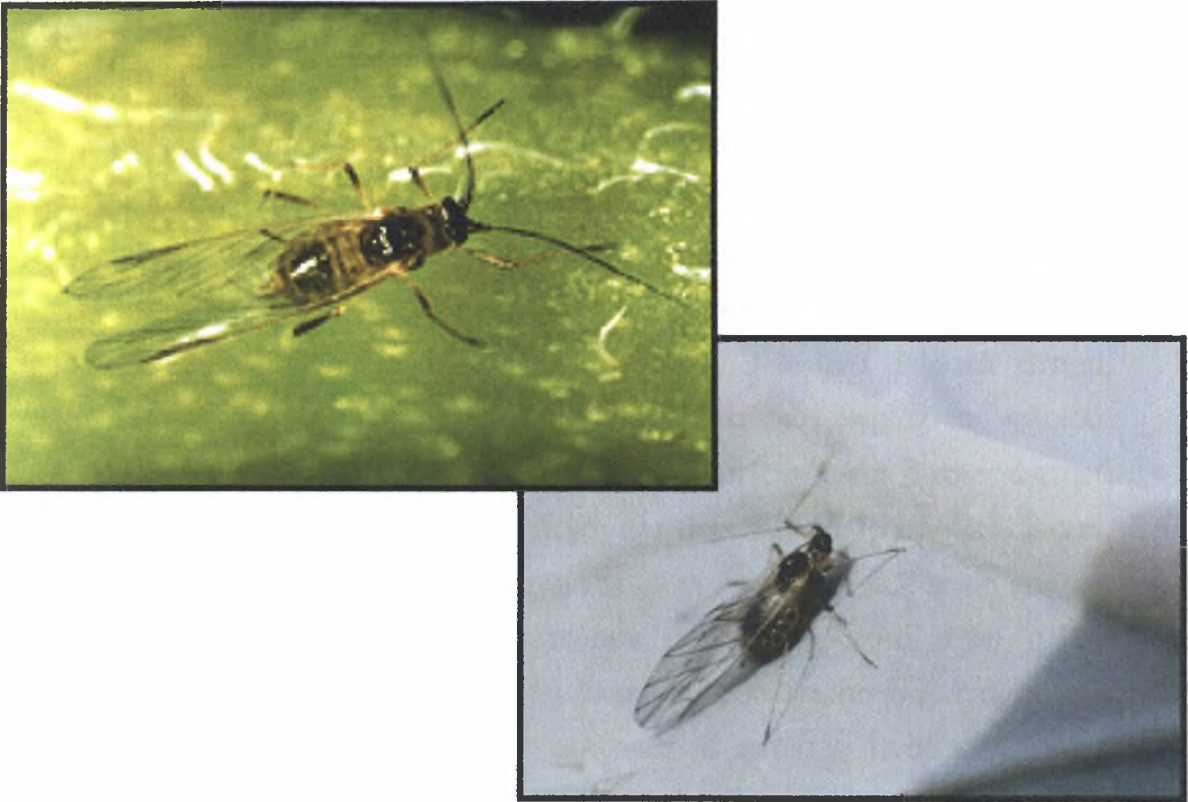


περιοχή επί του νωτιαίου μέρους της κοιλιάς. Τα ενήλικα θηλυκά ωτόκα έχουν συνήθως πορφυρό κόκκινο χρώμα ενώ στην περιοχή της κοιλιάς διακρίνεται ένα σκούρο τμήμα. Στα θηλυτόκα των πράσινων κλώνων, τα ενήλικα στάδια έχουν πράσινη απόχρωση που προοδευτικά γίνεται ρόδινη. Στους κόκκινους ή ρόδινους κλώνους το χρώμα παραμένει το ίδιο. Για την αναγνώρισή της από τα άλλα έντομα, χρησιμοποιούνται τα περισσότερο ευδιάκριτα μορφολογικά χαρακτηριστικά τα οποία και απεικονίζονται στην Εικόνα 1.1. (Dixon 1998).



**Εικόνα 1.1.** Διαγνωστικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της αφίδας (Heie 1980).

A. βάση του ρύγχους ανάμεσα στα πρόσθια ισχία, B. κεραίες με δύο κοντά και παχιά μετωπικά φυμάτια και ένα λεπτότερο μέρος, το μαστίγιο, το οποίο αποτελείται από το πολύ τέσσερα άρθρα. Το τελευταίο είναι λεπτότερο από τα άλλα, C. σύνθετος οφθαλμός ο οποίος αποτελείται από τρία ομματίδια, D. ταρσός με δύο άρθρα, E. κύρια επιμήκη νεύρωση στις πτέρυγες, και F. σίφωνες.



**Εικόνα 1.2.** Πτερωτά θηλυκά άτομα του είδους *Myzus persicae* (Sulzer).

### 1.2.3. Ξενιστές

Η αφίδα *M. persicae* είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος και προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών σε όλες τις ηπείρους. Από τα καλλιεργούμενα φυτά προσβάλλει είδη των οικογενειών Rosaceae, Solanaceae, Malvaceae, Compositae, Chenopodiaceae, Umbelliferae, Papilionaceae, Cruciferae. Προσβάλλει αρκετές καλλιέργειες ανάμεσα στις οποίες είναι: καπνός, πατάτα, τομάτα, μαρούλι, καρότο, κουκιά, τεύτλα, σπανάκι, λάχανο κ.α. Γεννά τα χειμερινά αυγά της κυρίως στη ροδακινιά *Prunus persica* L. καθώς και σε άλλα πυρηνόκαρπα όπως *P. nigra*, *P. tanella*, *P. serotina* καθώς και υβρίδια ροδακινιάς και αμυγδαλιάς (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

#### 1.2.4. Βιολογία

Το είδος είναι ετερόοικο, καθώς κατά τη διάρκεια του έτους μεταναστεύει από τον κύριο, στους δευτερεύοντες ξενιστές. Ο πρωτεύων ξενιστής τους είναι κυρίως η ροδακινιά, ενώ ποώδη φυτά αποτελούν τους δευτερεύοντες ξενιστές (Blackman 1971).

Έχει περισσότερες από πέντε γενιές το έτος. Σε περιοχές όπου επικρατεί ψυχρός χειμώνας, διαχειμάζει ως χειμερινό αυγό στο φλοιό των κύριων ξενιστών. Τα χειμερινά ωά, συνήθως 4-6 ανά θηλυκό άτομο, βρίσκονται στους οφθαλμούς ή σε εσοχές των αδρών μερών του φλοιού. Τέλος χειμώνα με αρχές άνοιξης τα ωά εκκολάπτονται και δίνουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά. Είναι τα λεγόμενα θεμελιωτικά ή ιδρυτικά άτομα. Ακολουθεί μικρός αριθμός παρθενογενετικών γενεών στην ροδακινιά και στη συνέχεια πτερωτά άτομα μεταναστεύουν σε ποώδη φυτά. Εκεί η μια παρθενογενετική γενιά ακολουθεί την άλλη. Το φθινόπωρο παράγονται στα ποώδη φυτά πτερωτά θηλυτόκα και αρσενικά τα οποία μεταναστεύουν στον πρωτεύοντα ξενιστή. Εκεί τα θηλυτόκα γεννούν τα ωοτόκα, τα οποία εναποθέτουν τα χειμερινά αυγά, μετά από σύζευξη με τα αρσενικά. Γενότυποι που ακολουθούν την παραπάνω στρατηγική διαχείμασης, χαρακτηρίζονται ως ολοκυκλικοί (van Emden *et.al.* 1969, Blackman 1971,1974).

Σε περιοχές με ηπιότερο χειμώνα καθώς και σε προστατευμένες περιοχές με πιο βαρύ χειμώνα, επικρατούν οι ανολοκυκλικοί κλώνοι οι οποίοι δεν έχουν τη δυνατότητα παραγωγής σεξουαλικών μορφών. Διαχειμάζουν και αναπαράγονται με παρθενογενετικές μορφές σε αυτοφυή φυτά ή σε χειμερινές καλλιέργειες (van Emden *et.al.* 1969, Blackman 1971,1974).

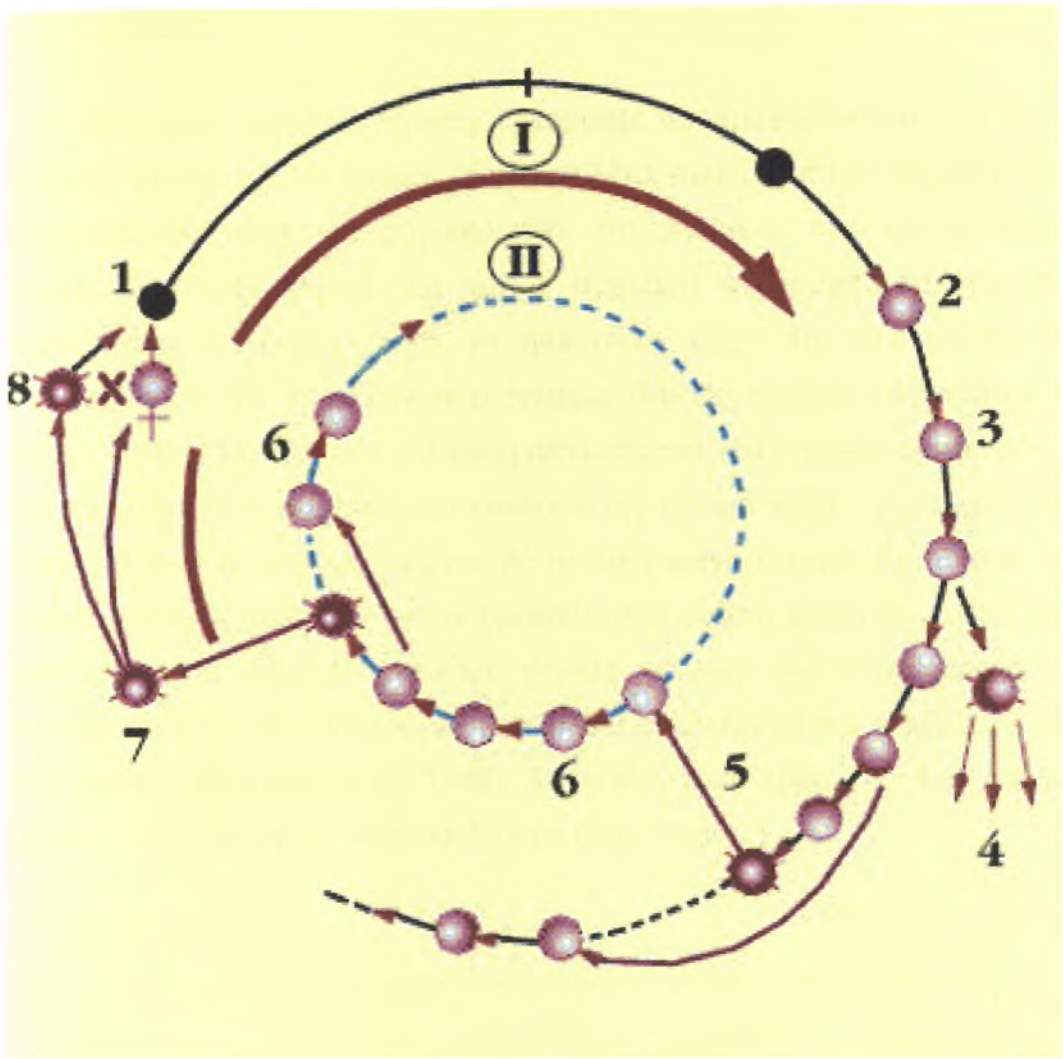
Επίσης υπάρχουν οι ανδροκυκλικοί και οι ενδιάμεσοι κλώνοι που χρησιμοποιούν και τις δύο στρατηγικές διαχείμασης. Το φθινόπωρο οι ανδροκυκλικοί κλώνοι παράγουν παρθενογενετικές μορφές, που θα διαχειμάσουν σε αυτοφυή φυτά ή χειμερινές καλλιέργειες, και αρσενικά που συμμετέχουν στη σεξουαλική φάση του είδους (van Emden *et.al.* 1969, Blackman 1971,1974). Οι ενδιάμεσοι κλώνοι γεννούν την ίδια εποχή πολλά άπτερα και πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά και λίγα αρσενικά και «ενδιάμεσα» πτερωτά. Τα «ενδιάμεσα» πτερωτά παράγουν κυρίως

παρθενογενετικές μορφές και μικρό αριθμό ωτόκων θηλυκών (Blackman 1971, 1972).

Στις περιοχές της Ελλάδας έχουν καταγραφεί και οι τέσσερις στρατηγικές διαχείμασης της *M. persicae*. Ωστόσο, βρέθηκε μια γεωγραφική διαφοροποίηση στο ποσοστό των ολοκυκλικών κλώνων, που συνδέθηκε με την αφθονία του κύριου ξενιστή. Συγκεκριμένα, στην κεντρική Μακεδονία, όπου η καλλιέργεια της ροδακινιάς είναι κυρίαρχη, το ποσοστό των ολοκυκλικών κλώνων ξεπερνά το 50% και φθάνει σε μερικές περιπτώσεις σε 100%. Στην ανατολική Μακεδονία, οι ολοκυκλικοί κλώνοι είναι επίσης συχνοί. Αντίθετα, στη νότια και στη βορειοανατολική Ελλάδα, όπου ο κύριος ξενιστής δεν αφθονεί, το ποσοστό των ολοκυκλικών κλώνων είναι πολύ μικρότερο και κυμαίνεται μεταξύ 0 και 33% (Margaritoroulos *et al.* 2002).

Με την ποικιλία μορφών (όπως παρθενογενετικά θηλυκά, ωτόκα κ. α.), τρόπου διαχείμασης, εναλλαγή ξενιστή και τροφική εξειδίκευση που παρουσιάζουν οι αφίδες, μπορούν να αποφεύγουν τις δυσμενείς για την επιβίωσή τους συνθήκες και να διαγωνίζονται (Shaposhnikov 1985).





**Σχήμα 1.1.** Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής του ετερόοικου είδους *Myzus persicae* (Sulzer).

Οι αφίδες εναλλάσσονται μεταξύ της ροδακινιάς (αρχικός ξενιστής) (1), και του πούδου ξενιστή (δευτερεύοντος) (2). Σε ζεστές συνθήκες, συνεχίζουν να αναπαράγονται στους δευτερεύοντες ξενιστές.

1: χειμερινό αυγό.

2: θεμελιωτικά ή ιδρυτικά (άπτερα).

3: άπτεροι παρθενογενετικοί, θηλυκοί απόγονοι των ιδρυτικών.

4: πτερωτά παρθενογενετικά, που εξασφαλίζουν την εξάπλωση.

5: μετανάστευση σε έναν δευτερεύοντα ξενιστή από τα πτερωτά παρθενογενετικά.

6: παρθενογενετικά, πτερωτά και άπτερα.

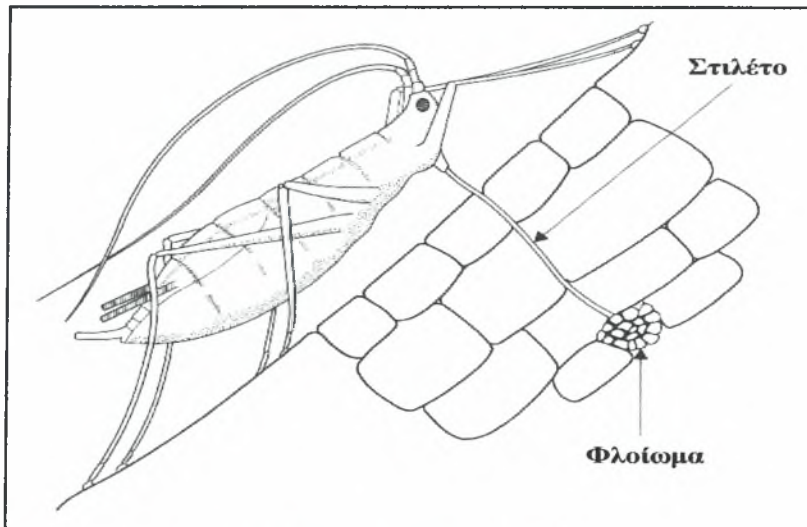
7: φυλογόνα (πτερωτά).

8: σεξουαλικές μορφές (πτερωτό αρσενικό, ωτόκο άπτερο θηλυκό)

([www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/3myzper.htm](http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/3myzper.htm) - 9k -).

### 1.2.5. Ζημιές

Προσβάλλει κατά προτίμηση τις κορυφές των τρυφερών βλαστών και τα τρυφερά φύλλα για να τραφεί. Με τα σιλέτα πραγματοποιεί νύγματα στον ενδοκυτταρικό χώρο και συγκεκριμένα στο φλοίωμα, από όπου αφαιρεί μεγάλη ποσότητα χυμού. Το νύγμα προκαλεί συστροφή, πράγμα που προστατεύει το έντομο από το ψεκαστικό υγρό και δυσκολεύει την καταπολέμησή του, όταν δεν γίνει έγκαιρα, δηλαδή προτού συστραφούν τα φύλλα. Επίσης, τα άφθονα μελιτώδη απεκκρίματα του εντόμου ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς και ευνοούν την καπνιά και τα μυρμηγκία που προστατεύουν τις αφίδες διώχνοντας τα αφιδοφάγα έντομα. Εκτός από την αξιόλογη άμεση ζημιά την οποία προκαλεί στα φυτά η αφίδα θεωρείται ένας από τους πιο αποτελεσματικούς φορείς πολλών ιών (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Μπορεί να μεταδώσει αποτελεσματικά πάνω από 100 ιούς φυτών (Kennedy *et.al.* 1962). Μεταδίδει τόσο έμμονους όσο και μη-έμμονους ιούς οι οποίοι παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.



**Εικόνα 1.3.** Αφίδα που τρέφεται (Κατής 2004).

**Πίνακας 1.1.** Ιοί που μεταδίδονται με το είδος *Myzus persicae* (Sulzer) (Blackman & Eastop 1984, Bruht *et.al.* 1996).

ΙΟΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
Ευλογιά της δαμασκηιάς ( <i>Plum rox virus</i> )	Μη-έμμος
Κίτρινο μωσαϊκό της κοινής κολοκυθιάς ( <i>Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV</i> )	Μη-έμμος
Μωσαϊκό τεύτλων ( <i>Beet mosaic virus, BtMV</i> )	Μη-έμμος
Μωσαϊκό μαρουλιού ( <i>Lettuce mosaic virus, LMV</i> )	Μη-έμμος
Αφιδομετίνος ίκτηρος κολοκυνθοειδών ( <i>Cucurbit aphid – borne yellows virus, CABYV</i> )	Έμμος
Ίκτηρος τεύτλων ( <i>Beet yellows virus, BYV</i> )	Ημί-έμμος
Καρούλιασμα φύλλων πατάτας ( <i>Potato leafroll virus, PRLV</i> )	Έμμος
Μωσαϊκό αγγουριάς ( <i>Cucumber mosaic virys, CMV</i> )	Μη-έμμος
Κίτρινη στίξη της κολοκυθιάς ( <i>Zucchini yellow fleck virus, ZYFV</i> )	Μη-έμμος
Ιός Υ της πατάτας ( <i>Potato virus Y, PVY</i> )	Μη-έμμος
Ιός Α της πατάτας ( <i>Potato virus A, PVA</i> )	Μη-έμμος
Μωσαϊκό μηδικής ( <i>Alfalfa mosaic virus, AMV</i> )	Μη-έμμος

### 1.2.6. Καταπολέμηση

Οι συνήθως πυκνοί πληθυσμοί της αφίδας, ο μεγάλος αριθμός γενεών, το έτος και η μετάδοση ιών στα φυτά, κατατάσσουν το έντομο ανάμεσα στους πιο βλαβερούς εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών. Το ότι με φυσικές συνθήκες τα άτομα του *M. persicae* δεν καταστρέφουν την φυτική παραγωγή, οφείλεται κατά ένα μεγάλο μέρος στους πολλούς και αποτελεσματικούς φυσικούς εχθρούς τους. Ανάμεσα στους αποτελεσματικούς φυσικούς εχθρούς της είναι αρπακτικά Νευρόπτερα των οικογενειών Chrysopidae και Hemerobiidae, αρπακτικά Κολεόπτερα της οικογένειας Coccinellidae, όπως *Adalia bipunctata* και *Coccinella septempunctata*, αρπακτικά Δίπτερα της οικογένειας Syrphidae και παρασιτοειδή Υμενόπτερα των οικογενειών Braconidae, Chalcididae και Proctotrupidae. Εντομοπαθογόνοι μύκητες του γένους *Entomophthora* είναι αποτελεσματικοί σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας, αλλά όχι στις παραμεσόγειες περιοχές (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Όσο είναι δυνατόν, πρέπει να διατηρούνται στις καλλιέργειες οι αποτελεσματικοί φυσικοί εχθροί των αφίδων, ώστε να μην χρειάζονται ψεκασμοί με εντομοκτόνα (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Ωστόσο, η διαχείριση των πληθυσμών της βασίζεται κυρίως στη χρήση χημικών ουσιών, ιδιαίτερα κλασικών οργανικών εντομοκτόνων. Η αποτελεσματικότητα αντιμετώπισης των πληθυσμών τους όμως ελαττώνεται συνεχώς εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα έντομα αυτά και της αύξησης του κόστους παραγωγής, λόγω επανειλημμένων εφαρμογών. Επιπρόσθετα, εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες, όπως περιβαλλοντικοί και κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία με τη χρήση τους, καθώς και δυσμενείς επιπτώσεις σε ωφέλιμα έντομα ή στο ίδιο το προϊόν με την υποβάθμισή του λόγω παρουσίας υπολειμμάτων εντομοκτόνων. Οι σύγχρονες τάσεις απαιτούν τη διαχείριση των εχθρών στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης Εχθρών (IPM). Στην IPM συνυπολογίζονται περιβαλλοντικοί και οικονομικοί παράγοντες παράλληλα με τη χρησιμοποίηση διαφόρων μεθόδων καταπολέμησης με έμφαση στη δράση των φυσικών εχθρών και τη χρήση, όπου απαιτείται, περιβαλλοντικά ήπιων εντομοκτόνων ουσιών (π.χ. imidacloprid). Ο έλεγχος των αφίδων πρέπει να συμπεριλαμβάνει όχι μόνο ελάττωση πληθυσμών, αλλά και την προστασία

των φυτών από προσβολές αφιδομεταδιδόμενων ιών που προκαλούν ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση του τελικού προϊόντος (Papadopoulou *et al.* 2004).

Πειραματική μελέτη των Papadopoulou *et al.* (2004), έδειξε ότι τα νέα, φιλικά προς το περιβάλλον εντομοκτόνα (π.χ. imidacloprid, acetamiprid, pyrethroids, thiamethoxam), προστατεύουν την καλλιέργεια του καπνού για μεγάλο διάστημα. Μάλιστα η αποτελεσματικότητά τους βελτιώνεται όταν γίνεται εφαρμογή υπερμικρού όγκου (U.L.V.) με χρήση ηλεκτροστατικού ψεκαστήρα. Επίσης, η χρησιμοποίηση εντομοκτόνων ουσιών (π.χ. imidacloprid, thiamethoxam) με το νερό εγκατάστασης της φυτείας μετά τη μεταφύτευση, αποδείχθηκε ικανοποιητική εναντίων των αφίδων για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα βιοεντομοκτόνα (π.χ. *Verticillium lecanii*) είναι πολλές φορές αποτελεσματικά στην καταπολέμηση των αφίδων, αλλά μόνο σε ιδιαίτερες συνθήκες, όπως σε υψηλά επίπεδα σχετικής υγρασίας. Άλλες πρακτικές, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα πλαίσια της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης, παρέχοντας μάλιστα ικανοποιητική προστασία από τις αφίδες, είναι η εφαρμογή του συστήματος επίπλευσης (floating system) με καλυμμένα ανοίγματα στα σπορεία και η κάλυψή τους με ειδικά δίκτυα εντομοστεγανότητας.



### 1.3. Ο ιός Y της πατάτας (*Potato virus Y* ή PVY)

Οι ιοί (viruses, ενικός: virus) των φυτών, είναι μια ιδιαίτερη κατηγορία έμβιων όντων. Σε αντίθεση με τα άλλα μεταδιδόμενα παθογόνα των φυτών (βακτήρια, ρικκέτσιες, μυκοπλάσματα), οι ιοί δεν είναι ζωντανοί οργανισμοί. Επίσης έχουν πιο απλή χημική σύνθεση και σημαντικά μικρότερο μέγεθος (Κυριακοπούλου 1996).

Σύμφωνα με τον ορισμό του Matthews (1981), «ο ιός είναι μια σειρά από ένα ή περισσότερα μόρια αναπαραγόμενων νουκλεϊκών οξέων, κατά κανόνα εγκλεισμένα εντός προστατευτικού πρωτεϊνικού ή λιποπρωτεϊνικού περιβλήματος, η οποία είναι ικανή να οργανώσει την αναπαραγωγή του εαυτού της εντός κατάλληλων ξενιστών κυττάρων».

Ο συνολικός αριθμός των γνωστών μέχρι σήμερα ειδών των ιών των φυτών υπολογίζεται σε 800 περίπου. Είναι ιοί των ανώτερων φυτών και ιδιαίτερα των αγγειοσπέρμων, έχουν όμως βρεθεί ιοί και στα γυμνόσπερμα, καθώς και στα κατώτερα φυτά. Ανάμεσά τους συμπεριλαμβάνεται και ο ιός Y της πατάτας (*Potato virus Y* ή PVY) (Κυριακοπούλου 1996).

Ο PVY ανήκει στην οικογένεια *Potyviridae* (Walsh *et al* 2000). Τα μέλη της διαιρούνται, ανάλογα με το μέγεθος των ισωματίων και του γονιδιώματος, την οργάνωση του γονιδιώματος και τον τύπο του φορέα σε έξη γένη: *Potyvirus* (μετάδοση με αφίδες), *Rymovirus*, *Bymovirus*, *Ipotovirus*, *Macluravirus* και το γένος *Tritimovirus* (Κατής 2000). Το γένος *Potyvirus* είναι μια μεγάλη και οικονομικά πολύ σημαντική ομάδα ιών. Τα μέλη του γένους προκαλούν σοβαρές ασθένειες. Είναι η πιο άφθονη ομάδα ιών του φυτού της πατάτας (Perez *et al* 1995). Τυπικό μέλος του γένους *Potyvirus* είναι ο ιός Y της πατάτας.

Άλλα μέλη του γένους είναι: ο ιός του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς (*Bean common mosaic virus*, BCMV), ο ιός του κίτρινου μωσαϊκού της φασολιάς (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV), ο ιός του μωσαϊκού των τεύτλων (*Beet mosaic virus*, BtMV), ο ιός των λεπτών φύλλων του καρότου (*Carrot thin leaf virus*, CTLV), ο ιός του μωσαϊκού του σέλινου (*Celery mosaic virus*, CeMV), ο ιός της κίτρινης ράβδωσης του πράσου (*Leek yellow stripe virus*, LYSV), ο ιός του μωσαϊκού του μαρουλιού (*Lettuce mosaic virus*, LMV), ο ιός του κίτρινου νανισμού του κρεμμυδιού (*Onion yellow dwarf virus*,

OYDV), ο ιός της ευλογιάς της δαμασκηιάς (*Plum pox virus*, PPV), ο ιός του σπορομεταδιδόμενου μωσαϊκού του αρακά (*Pea seed borne mosaic virus*, PSbMV), ο ιός της ποικιλόχρωσης της πιπεριάς (*Pepper veinal mottle virus*, PVMV), ο ιός A της πατάτας (*Potato virus A*, PVA), ο ιός του μωσαϊκού της σόγιας (*Soybean mosaic virus*, SoMV), ο ιός του μωσαϊκού του σακχαροκάλαμου (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV), ο ιός της ποικιλοχλώρωσης των νεύρων του καπνού (*Tobacco vein mottling virus*, TYMV), ο ιός του μωσαϊκού του γογγυλιού (*Turnip mosaic virus*, TuMV), ο ιός του κίτρινου μωσαϊκού της κοινής κολοκυθιάς (*Zucchini yellow mosaic virus c*, ZYMV) και ο ιός του μωσαϊκού 2 της καρπουζιάς (*Watermelon mosaic virus*, WMV) (Κατής 2000).

### 1.3.1. Χαρακτηριστικά

Ο ιός Y της πατάτας (*Potato virus Y* ή PVY), όπως και όλοι οι φυτικοί ιοί, έχει κωδικοποιημένες σε νουκλεϊκό οξύ όλες τις πληροφορίες που χρειάζεται για να αναπαράγει τον εαυτό του. Η αναπαραγωγή του όμως γίνεται στο κυτταρόπλασμα κάποιου κυττάρου ξενιστή που του παρέχει τα αναγκαία ένζυμα για να πολλαπλασιαστεί. Το κύτταρο επίσης παρέχει τα μικρομόρια (πουρίνες, πυριμιδίνες, αμινοξέα), τα ριβοσώματα, τους RNA-μεταφορείς (transfer-RNA) καθώς και την ενέργεια, που χρειάζεται για τη σύνθεση των συστατικών του ιού (Γεωργόπουλος 1984).

Το νουκλεϊκό οξύ του PVY είναι το RNA. Πρόκειται για ένα μακρύ μονόκλωνο RNA γονιδίωμα το οποίο βρίσκεται σε ιοσώματα (Walsh *et al* 2000). Τα ιοσώματα είναι νηματοειδή, δεν είναι περιτυλιγμένα, συνήθως είναι εύκαμπτα με μήκος 684 nm ή 730 nm και 11 nm πλάτος. Περιέχουν 5 – 8% νουκλεϊκό οξύ το οποίο περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο. Το πρωτεϊνικό καψίδιο περιέχει 92 – 95 % πρωτεΐνη. Ο ρόλος της πρωτεΐνης είναι ρόλος προστατευτικός και ρόλος αντιγονικής εξειδίκευσης. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη του καψιδίου δεσμεύεται στα στοματικά μόρια των αφίδων φορέων του ιού, με τη μεσολάβηση μιας ιογενούς κωδικοποιημένης πρωτεΐνης, της βοηθητικής πρωτεΐνης, η οποία παράγεται στο μολυσμένο ξενιστή και έτσι καθίσταται δυνατή η μετάδοση του ιού σε άλλα φυτά ξενιστές

(Collar & Fereres 1998). Τέλος, το γονιδίωμα του PVY έχει κρυμμένο αξονικό κανάλι, 2-3 nm διάμετρο και κρυμμένο βασικό έλικα με κατακόρυφη ταλάντωση του βασικού έλικα 3.3 nm (Buchen & Osmond 1987).

### 1.3.2. Φυλές

Αρκετές ομάδες φυλών μπορούν να διακριθούν σύμφωνα με τα γενικά και τυπικά συμπτώματα που προκαλεί ο ιός στα φυτά *Nicotiana tabacum*, *Physalis floridana*, *Solanum tuberosum* αλλά και σε άλλες καλλιέργειες. Ωστόσο, οι σημαντικότερες ομάδες είναι:

- Ομάδα του ιού  $Y^0$  της πατάτας (κοινή φυλή). Προκαλεί κυρίως σοβαρή ράβδωση ή τραχύτητα στα φύλλα της πατάτας, γενική νέκρωση στο φυτό *Physalis floridana* και γενική κηλίδωση στον καπνό.
- Ομάδα του ιού  $Y^N$  της πατάτας (νέκρωση των ακροπεταλίων του καπνού). Προκαλεί σοβαρή νέκρωση των νεύρων στον καπνό, γενική κηλίδωση στο φυτό *Physalis floridana* και πολύ ήπια κηλίδωση σε όλες τις καλλιέργειες.
- Ομάδα του  $Y^C$  της πατάτας (φυλή ραβδωτής χάραξης, συμπεριλαμβανομένου του ιού C της πατάτας). Ο ιός C της πατάτας δεν μπορεί να μεταδοθεί μόνος του από την *Myzus persicae*, αλλά άλλες φυλές σε αυτή την ομάδα μπορούν. Πολλές καλλιέργειες είναι υπερευαίσθητες σε αυτή την ομάδα. Ευπαθείς καλλιέργειες μπορεί να παρουσιάσουν μωσαϊκό ή ποκιλοχλώρωση. Τα συμπτώματα στα φυτά *Nicotiana tabacum* και *Physalis floridana*, είναι παρόμοια με αυτά που προκαλεί η φυλή  $Y^0$  (Bokx & Huttinga 1981).

### 1.3.3. Γεωγραφική διανομή

Ο ιός Y της πατάτας (*Potato virus Y* ή PVY) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εντομομεταδιδόμενους ιούς της πατάτας στην Ελλάδα και διεθνώς. Πιθανότατα εξαπλώνεται παγκοσμίως σε περιοχές όπου μεγαλώνει η πατάτα και σε υπαίθριες καλλιέργειες πιπεριάς, καπνού και ντομάτας σε θερμότερες χώρες. Οι φυλές του Y<sup>ο</sup> εξαπλώνονται παγκόσμια, οι φυλές Y<sup>N</sup> υπάρχουν στην Ευρώπη συμπεριλαμβανομένης και της πρώην Σοβιετικής Ένωσης, τμήματα της Αφρικής και της Νότιας Αμερικής, οι φυλές Y<sup>C</sup> συμπεριλαμβανομένου και του ιού C της πατάτας παρουσιάζονται πιθανότατα στην Αυστραλία, την Ινδία και κάποια τμήματα του Ηνωμένου Βασιλείου και της ηπειρωτικής Ευρώπης (Buchen & Osmond 1987).

### 1.3.4. Ξενιστές

Ο κύκλος των ξενιστών περιορίζεται κυρίως στην οικογένεια Solanaceae, παρόλο που κάποια είδη των οικογενειών Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Compositae και Leguminosae είναι επίσης ευπαθή (Perez *et al.* 1995). Κυρίως ο PVY μολύνει τα φυτά της οικογένειας Solanaceae, όπως καπνός, ντομάτα, πιπεριά και πατάτα και έχει σημαντική επίδραση στην πατάτα και σε άλλα φυτά της οικογένειας, προκαλώντας και ποιοτικές αλλά και ποσοτικές ζημιές. Έχουν αναφερθεί απώλειες σοδειάς της τάξεως του 10-80% στην πατάτα και μαζί με τον ιό του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας και με τον ιό X της πατάτας λογοδοτούν για ολοκληρωτική απώλεια της παραγωγής. Τέλος ζιζάνια όπως το *Solanum atropurpureum* και άλλα είδη *Solanum* μπορούν επίσης να μολυνθούν από τον ιό και να ενεργούν ως σημαντικές πηγές διατήρησης και μετάδοσής του (Walsh *et al.* 2000).

### 1.3.5. Συμπτώματα

Τα συμπτώματα που προκαλεί ο ιός Y της πατάτας ποικίλουν κατά πολύ ανάμεσα στα καλλιεργούμενα είδη και ποικιλίες των φυτών και τις φυλές του

ιού. Για παράδειγμα τα συμπτώματα του PVY<sup>0</sup> στην πατάτα περιλαμβάνουν σοβαρή ράβδωση ή τραχύτητα ενώ ο PVY<sup>N</sup> προκαλεί κυρίως ήπια ποικιλοχλώρωση. Επηρεάζονται επίσης από τις επικρατούσες κλιματολογικές συνθήκες. Ωστόσο, τυπικά συμπτώματα είναι η ποικιλοχλώρωση των φύλλων, διαφάνεια των νευρώσεων, μωσαϊκό, ζάρωμα, τραχύτητα και μερικές φορές παραμόρφωση, νανισμός, εύθραυστο φύλλωμα και νέκρωση. Οι μικτές μολύνσεις από τον ιό Y της πατάτας και τον ιό X της πατάτας, δημιουργούν σοβαρά συμπτώματα που οδηγούν σε «μωσαϊκό rugose». Στα λουλούδια μπορεί να συμβεί καταστροφή του χρώματος. (Walsh *et al.* 2000, Buchen & Osmond 1987).

Συνηθισμένες ανατομικές και φυσιολογικές ανωμαλίες που διαπιστώνονται στα μολυσμένα από τον ιό φυτά, είναι η μείωση της χλωροφύλλης, ο αυξημένος ρυθμός αναπνοής, η εμφάνιση εγκλείστων στα μολυσμένα κύτταρα και κρύσταλλοι στον πυρήνα, που δεν υπάρχουν στα αμόλυντα φυτά. Επίσης, υπάρχουν ιοσώματα στην επιδερμίδα, στο κυτταρόπλασμα και στο κενοτόπιο του κυττάρου και τα μιτοχόνδρια συχνά περιβάλλονται από ίνες με διάμετρο από 9-10 nm (Buchen & Osmond 1987).



**Εικόνα 1.3.1.** Φύλλο πατάτας με συμπτώματα από την νεκρωτική φυλή του ιού PVY ([plantpath.ifas.ufl.edu/Inclusionpage/potato/PVYpotato.html](http://plantpath.ifas.ufl.edu/Inclusionpage/potato/PVYpotato.html)).



### 1.3.6. Μετάδοση

Ο ιός Υ της πατάτας μεταδίδεται με μηχανικό τρόπο και με εμβολιασμό ενώ σε συνθήκες χωραφιού, μεταδίδεται κυρίως από τις αφίδες (Hemiptera, Aphididae). Ο ιός δεν χρειάζεται βοηθητικό ιό για την μετάδοσή του από τον φορέα του, αντίθετα, μπορεί να βοηθήσει στη μετάδοση ενός άλλου ιού (μωσαϊκό τύπου aucuba της πατάτας, Potato aucuba mosaic virus). Πειραματικά στοιχεία αναφέρουν μετάδοση και από αλευρώδεις, μύκητες καθώς και δίπτερα (Buchen & Osmond 1987).

Ο PVY μεταδίδεται κατά μη έμμονο τρόπο. Δηλαδή προσλαμβάνεται από τους φορείς κατά τη διάρκεια ενδοκυτταρικών διεισδύσεων στην επιδερμίδα και το μεσόφυλλο. Οι ενδοκυτταρικές διεισδύσεις από τις αφίδες είναι πολύ σύντομες και συχνές. Συμβαίνουν κατά μέσο όρο σε διαστήματα του ενός λεπτού και διαρκούν περίπου πέντε έως επτά δευτερόλεπτα. Για τα άλλα ημίπτερα, αυτά τα επιφανειακά νύγματα δοκιμών κυτταρικού χυμού, συμβαίνουν πολύ λιγότερο συχνά απ' ό,τι στις αφίδες, αν και μπορεί να διαρκέσουν περισσότερο. Το προαναφερόμενο πιθανόν να σχετίζεται με το γεγονός ότι οι αφίδες δεν έχουν όπως τα άλλα ημίπτερα, χημικοδεκτικά αισθητήρια όργανα στους ταρσούς ή στην κορυφή του χείλους και κατά συνέπεια, η κατάποση του κυτταρικού χυμού διαμέσου του τροφικού αγωγού είναι αναγκαία για να ελέγξουν την καταλληλότητα ή μη του φυτού ως ξενιστή και να εντοπίσουν την ευνοϊκή θέση πάνω στον ξενιστή τους. Με αυτή τη διαδικασία, οι αφίδες μπορούν να προσλάβουν τους μη έμμοτους ιούς πολύ αποτελεσματικά (Feres & Collar 2001). Μετά την πρόσληψη, ο ιός μπορεί να μεταδοθεί αμέσως, χωρίς να απαιτείται χρόνος επώασης. Οι αφίδες διατηρούν τη μολυσματικότητά τους για λίγα λεπτά έως και περισσότερο από 24 ώρες, μετά την απομάκρυνσή τους από το ασθενές φυτό (Perez *et al.* 1995).

Αποδείχτηκε πως ο PVY και γενικότερα οι μη έμμοτοι ιοί, μεταδίδονται πιο εύκολα από πτερωτά είδη αφίδων που δεν αποικίζουν την καλλιέργεια απ' ό,τι από άπτερα είδη που αποικίζουν την εκάστοτε καλλιέργεια (Feres *et al.*, 1993). Οι πτερωτές αφίδες προσανατολίζονται οπτικά προς τα φυτά. Ελκύονται στο φως με πορτοκαλί, κίτρινα και πράσινα μήκη κύματος

(>500μm). Η διαφορά ανάμεσα στα πράσινα φυτά και στο σκούρο έδαφος φαίνονται να είναι ιδιαίτερα ελκυστική στις αφίδες. Ο Brook (1968, 1973) παρατήρησε ότι οι περισσότερες αφίδες προσεγγίζουν πιο εύκολα τις καλλιέργειες στις οποίες οι αποστάσεις μεταξύ των φυτών είναι μεγάλες, παρά τις καλλιέργειες με μικρές αποστάσεις φύτευσης – σποράς, και απέδωσε τη διαφορά στο μεγαλύτερο αριθμό αντίθεσης φυτού/ εδάφους που υπήρχε στις καλλιέργειες με μεγαλύτερες διατάξεις στο χώρο.

Όταν οι αφίδες αποικίζουν ένα χωράφι, η προσβολή τείνει να ξεκινά από τις περιφέρειες, ειδικά όταν οι περιφέρειες συσχετίζονται με την κατεύθυνση του αέρα και βρίσκονται κοντά σε κατασκευές, όπως φράχτες, όρια δασικής ανάπτυξης και κτίρια. Συνεπώς, οι περιπτώσεις πολλών ιών που μεταδίδονται από αφίδες είναι περισσότερο συχνές στις περιφέρειες χωραφιών, ειδικά αν η πηγή και των αφίδων και του ιού είναι εκτός της καλλιέργειας (DiFonzo 1995).

Τουλάχιστον 53 διαφορετικά είδη αφίδων, συγκαταλέγονται στους φορείς του ιού της ράβδωσης της πατάτας (Πίνακας 3.6). Από αυτούς, το είδος *Myzus persicae* αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο από το είδος *Aphis gossypii* (Glover) και το *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Walsh *et al.* 2000).

Η διαφορετική ικανότητα μετάδοσης των αφίδων φορέων του PVY, οφείλεται κυρίως στη διαφορετική συχνότητα πραγματοποίησης επιφανειακών νυγμάτων. Οι Powell *et al.* (1992) διαπίστωσαν πως υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στη συχνότητα των ενδοκυτταρικών διεισδύσεων και τη μετάδοση του ιού Y της πατάτας, όταν συγκρίθηκε η συμπεριφορά διαφορετικών ειδών αφίδων, κατά τη διάρκεια εκτέλεσης νυγμάτων σε φυτά πιπεριάς. Τα είδη που αποικίζουν την πιπεριά (*M. persicae* και *A. gossypii*), δείχνουν μια τυπική πρώιμη συμπεριφορά δοκιμής κυτταρικού χυμού, ενώ τα είδη που δεν αποικίζουν την πιπεριά (*S. avenae* και *R. padi*), έχουν την τάση να κινούνται κατά μήκος του φύλλου. Αλλά και όταν πραγματοποιούν νήγματα, αυτά είναι πολύ σύντομα, χωρίς να λαμβάνει χώρα η διαδικασία της κατάποσης, και συνεπώς οι πιθανότητες για πρόσληψη του ιού είναι πολύ μικρές. Επιπλέον, πολλά άτομα *S. avenae* και *R. padi*, δεν χρειάστηκε να πραγματοποιήσουν επιφανειακά νύγματα δοκιμής κυτταρικού χυμού του φυτού για να το αποκλείσουν ως ξενιστή τους. Οσφρητικοί υποδοχείς στις

κεραίες, τους ταρσούς ή στην άκρη του σιλέτου τους, μπορεί να είναι αρκετά για τον προσδιορισμό του φυτού ως μη κατάλληλο για αποικισμό (Collar & Fereres 1998, 2001). Οπωσδήποτε, μολονότι αυτά τα είδη δεν είναι αποτελεσματικοί φορείς του PVY, δεν πρέπει να αποκλείονται από επιδημιολογικής άποψης, ως ενδεχόμενοι φορείς σε αγρούς με πιπεριές (Perez *et al.* 1995). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι, και η βοηθητική πρωτεΐνη του PVY συμβάλει στην αποτελεσματική μετάδοση από τις αφίδες. Συγκεκριμένα, η βοηθητική πρωτεΐνη και τα ισωμάτια, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με συστατικά του σιέλου και διαφορές στη σύνθεση του σιέλου των διαφόρων ειδών, μπορεί να καταλήξει σε διαφοροποίηση του ποσοστού μετάδοσης (Fereres & Collar 2001).

Συνεπώς, η επιδημιολογία του PVY διαφοροποιείται ανάμεσα στις καλλιεργούμενες περιοχές καθώς και μεταξύ των ετών στην ίδια περιοχή καλλιέργειας και εξαρτάται από τα είδη αφίδων που παρουσιάζονται, το σχετικό μέγεθος των πληθυσμών τους, τη συμπεριφορά αναζήτησης ξενιστή που εκδηλώνουν και την τροφική δραστηριότητα που επιδεικνύουν, καθώς και τις καλλιεργητικές πρακτικές που εφαρμόζονται στην κάθε περιοχή (Difonzo, 1995).

**Πίνακας 3.6.** Είδη αφίδων, φορείς του PVY (DiFonzo, 1995).

<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>Capitophorus elaeagni</i>	<i>Metapolophium dirhodum</i>
<i>Acyrtosiphon primulae</i>	<i>Capitophorus hippophaes</i>	<i>Metapolophium festucae</i>
<i>Aphis spp.</i>	<i>Cavariella aegopodii</i>	<i>Myzaphis rosarum</i>
<i>Aphis abbreviata</i>	<i>Cavariella pastinacea</i>	<i>Myzus cerasi</i>
<i>Aphis citricola</i>	<i>Cryptomyzus ballotae</i>	<i>Myzus certus</i>
<i>Aphis craccinora</i>	<i>Cryptomyzus galeopsidis</i>	<i>Myzus circumflexus</i>
<i>Aphis fabae</i>	<i>Cryptomyzus ribis</i>	<i>Myzus ligustri</i>
<i>Aphis gossypii</i>	<i>Drepanosiphum platanoides</i>	<i>Myzus myosotidis</i>
<i>Aphis nasturtii</i>	<i>Dysaphis spp.</i>	<i>Phorodon humuli</i>
<i>Aphis pomi</i>	<i>Hyadaphis erysimi</i>	<i>Rhopalosiphoninus staphyleae</i> <i>tulipaellus</i>
<i>Aphis rhamni</i>	<i>Hyadaphis foeniculi</i>	<i>Rhopalosiphum insertum</i>
<i>Aphis sambuci</i>	<i>Hyalopterus pruni</i>	<i>Rhopalosiphum maidis</i>
<i>Aulacorthum circumflexus</i>	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>
<i>Aulacorthum solani</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	<i>Schizaphis graminum</i>
<i>Brachycaudus spp.</i>	<i>Macrosiphum gei</i>	<i>Sitobion avenae</i>
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	<i>Macrosiphum solanifoli</i>	<i>Sitobion fragariae</i>
<i>Capitophorus braggii</i>	<i>Metapolophium albidum</i>	<i>Uroleucon spp.</i>

### 1.3.7. Ανίχνευση

Οι αρχές στις οποίες βασίζονται οι διαγνωστικές μέθοδοι του ιού Υ της πατάτας και των υπόλοιπων φυτικών ιών, στηρίζονται στις βιολογικές τους αντιδράσεις, δηλαδή στα συμπτώματα που προκαλούν στους ξενιστές τους, στην άμεση παρατήρηση των σωματιδίων τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και στην ανίχνευση των επί μέρους συστατικών του σωματιδίου τους, δηλαδή της πρωτεΐνης καψιδίου ή φακέλου του ιού και του νουκλεοξέος του. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται ορολογικές μέθοδοι (Κυριακοπούλου 1996).

Συγκεκριμένα, ο PVY μπορεί να ανιχνευτεί με ανοσοενζυμική ανάλυση (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) των μολυσμένων φυτών και με την Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης σε συνδυασμό με αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR). Με RT-PCR μπορούν επίσης να διαχωριστούν και οι φυλές του ιού (Walsh *et al.* 2000).

### 1.3.8. Έλεγχος του PVY

Ο ιός Υ της πατάτας ως ιός μεταδιδόμενος με μη έμμοιο τρόπο είναι δύσκολο να ελεγχθεί, αφού τα μεταναστευτικά και μη μεταναστευτικά είδη αφίδας μπορούν να τον μεταδώσουν ακόμα και μετά από σύντομα νύγματα διατροφής στα μολυσμένα φυτά (Katis *et al.* 1998).

Η μείωση του αριθμού των φορέων του ιού Υ της πατάτας συνήθως περιλαμβάνει τη χρήση εντομοκτόνων, εναντίον των μεταναστευτικών αφίδων που μεταδίδουν τους ιούς από τα φυτά πηγές σε φυτά εντός της καλλιέργειας. Ωστόσο, γενικά, τα εντομοκτόνα δεν μπορούν να ελέγξουν τις μεταναστευτικές πτερωτές αφίδες που μεταδίδουν τους μη έμμοιους ιούς (συμπεριλαμβανομένου του ιού Υ της πατάτας). Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται στον πατατόσπορο δεν μπορούν να εμποδίσουν τη διαδικασία σταδιακής δημιουργίας των πιθανών φορέων αφίδων σε γειτονικές καλλιέργειες και ζιζάνια και δεν μπορούν να θανατώσουν τις εισερχόμενες



ιοφόρες αφίδες τόσο γρήγορα ώστε να εμποδίσουν τη μετάδοση του ιού Υ της πατάτας, αφού και ένα απλό νύγμα δοκιμής μπορεί να μεταδώσει τον ιό. Επιπλέον, τα εντομοκτόνα αυξάνουν την κίνηση των αφίδων μέσα στην καλλιέργεια και με την επανειλημμένη εφαρμογή οδηγούν σε επανεμφάνιση των πληθυσμών των αφίδων. Η αύξηση του πληθυσμού των αφίδων και της κινητικής τους δραστηριότητας, συμβάλουν στη μεγαλύτερη διάδοση του ιού Υ της πατάτας (DiFonzo 1995).

Οι κύριες μέθοδοι ελέγχου του PVY είναι:

- 1) Η αποφυγή της μόλυνσης, δηλαδή ανάπτυξη των καλλιεργειών όταν οι φορείς είναι απόντες ή οι αριθμοί είναι μικροί.
- 2) Η μη ανάπτυξη των καλλιεργειών κοντά σε υπάρχουσες καλλιέργειες του ίδιου είδους.
- 3) Η καταστροφή του υπέργειου μέρους των φυτών στις καλλιέργειες πατατόσπορου λίγο πριν την ωριμότητα, στο τέλος της περιόδου ανάπτυξης, περιορίζει την εξάπλωση του ιού (μεταφορά στον κόνδυλο).
- 4) Ψεκασμός με ορυκτέλαια για τη μείωση της συχνότητας της μετάδοσης. Η εφαρμογή ψεκασμών με ορυκτέλαια είναι μια σχετικά αποτελεσματική μέθοδος ελέγχου των μη-έμμονων ιών στον αγρό. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός της δράσης παραμένει ασαφής. Το έλαιο μπορεί να ενεργεί εμποδίζοντας την προσκόλληση του ιού ή την εκλεκτική προσρόφηση απ' τα μέρη του στόματος της αφίδας, ή να εμποδίζει τη δράση της βοηθητικής πρωτεΐνης. Ωστόσο, εάν το έλαιο ενεργεί στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στον ιό και τον φορέα, είναι δύσκολο να εξηγηθεί η ανασταλτική επίδρασή του στην μετάδοση των μη-έμμονων ιών. Η μείωση στη μετάδοση του ιού φαίνεται να είναι ανεξάρτητη απ' τη δομή των ιοσωματίων, της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας και της εξάρτησης από τη βοηθητική πρωτεΐνη. Υποστηρίζεται επίσης ότι το έλαιο επηρεάζει τη συμπεριφορά διείσδυσης του στιλέτου, πιθανόν μέσω της παρέμβασης στις αισθητήριες δομές του χείλους της αφίδας ή των στιλέτων. Η παρουσία ελαίου στην επιφάνεια του φύλλου μπορεί να προκαλέσει λίπανση των ταρσών ή του χείλους της αφίδας, αποτρέποντας έτσι τα έντομα απ' το να βρουν ένα σταθερό κράτημα κατάλληλο για εισαγωγή του στιλέτου.

Σε οποιαδήποτε περίπτωση η επίδραση του ορυκτέλαιου καταλήγει σε μειωμένη πιθανότητα μετάδοσης των μη έμμονων ιών στον αγρό (Powell 1991).

5) Χρησιμοποίηση ανθεκτικών ή ανεκτικών ποικιλιών.

6) Χρήση κίτρινων κολλωδών φύλλων και αντανακλαστικών καλυμμάτων. Τα αντανακλαστικά καλύμματα τοποθετούνται στην επιφάνεια του εδάφους που μένει ακάλυπτη από τα φυτά της καλλιέργειας (Buchem & Osmond 1987). Ενώ οι αφίδες που αναζητούν ξενιστή ελκύονται από τα πράσινα και τα κίτρινα, φαίνεται ότι απωθούνται από τα μπλε, τα βιολετί και τα υπεριώδη μήκη κύματος. Τα αντανακλαστικά καλύμματα προστασίας των φυτών που αντανακλούν τέτοια μήκη κύματος, απωθούν τις αφίδες από τα φυτά της καλλιέργειας και συνεπώς μειώνουν τη διάδοση του ιού. Το κάλυμμα από φύλλα αλουμινίου μείωσε το ρυθμό προσέλευσης των αφίδων στα φυτά στο 96%. Το αλουμινόχαρτο δεν είναι το μόνο υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης αχυρένιο κάλυμμα καθώς και λευκό πλαστικό κάλυμμα, με ποσοστό επιτυχίας 68%.

7) Χρήση ζώνης άλλου είδους φυτών στην καλλιέργεια για να μειωθεί η προσβολή των φυτών από τις αφίδες και κατά συνέπεια η μετάδοση του ιού. Ο Jenkinson (1955) ανέφερε μείωση στο ποσοστό μετάδοσης του ιού μωσαϊκό του κουνουπιδιού (Cauliflower mosaic virus, CaMV) σε φυτείες με μπρόκολα, στην περιφέρεια των οποίων υπήρχε ζώνη φασολιού, λάχανου ή κριθαριού. Η μείωση στο ποσοστό μετάδοσης ήταν αξιόλογη ακόμα και στην περίπτωση που οι φυτείες απείχαν μόλις λίγα μέτρα από την πηγή μόλυνσης. Το αποτέλεσμα της ύπαρξης ζώνης είναι η καθυστερημένη κίνηση των ιοφόρων άπτερων αφίδων, η οποία συμβάλει στην εξάλειψη ή μείωση της μολυσματικότητας (DiFonzo 1995).

Τέλος πρέπει να σημειωθεί πως η γνώση της εποχικής αφθονίας και της σύνθεσης των ειδών αφίδων, είναι απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη μιας στρατηγικής ελέγχου ενάντια στον ιό (Katis *et al.* 1998).

## 1.4. Μετάδοση των φυτικών ιών με έντομα

Οι ιοί των φυτών δεν εξέρχονται ποτέ από τα φυτά ξενιστές. Έτσι, οι φυτικοί ιοί δεν μπορεί να μεταφερθούν με τον άνεμο ή τη βροχή. Ακόμα και αν με κάποιο τρόπο βγει από τα φυτικά κύτταρα χυμός, τα σωματίδια ιών που τυχόν περιέχονται στο χυμό αυτό, δεν μπορούν να μολύνουν άλλα φυτά, αν δεν υπάρξει δυνατότητα εισαγωγής τους μέσα σε ζωντανό κύτταρο. Οι ιοί των φυτών δεν έχουν τη δυνατότητα να προσκολλώνται πάνω στην επιφάνεια του συγκεκριμένου ξενιστή και με ενεργό τρόπο να στέλνουν το νουκλεϊκό οξύ στο πρωτόπλασμα. Τα κύτταρα των φυτών έχουν κυτταρικό τοίχωμα, που δεν επιτρέπει παραλαβή ιών με πινοκύτωση (εγκόλπωση της κυττοπλασματικής μεμβράνης), όπως φαίνεται ότι συμβαίνει στα ζωικά κύτταρα (Γεωργόπουλος 1984).

Στη φύση, για να επιτευχθεί η είσοδος των φυτικών ιών, απαιτείται λύση της συνεχείας των προστατευτικών στρωμάτων του κυτταρικού τοιχώματος και της κυττοπλασματικής μεμβράνης, δηλαδή δημιουργία πληγών. Εξαιρέση θα μπορούσε να θεωρηθεί η μεταφορά ιών με τους κόκκους της γύρης. Πληγές μπορούν να προκληθούν είτε μηχανικά, με επαφή και τριβή γειτονικών φυτών, ή από οργανισμούς που μεταδίδουν ιούς. Ο οργανισμός ο οποίος μεταφέρει τον ιό από ασθενές σε υγιές φυτό ονομάζεται φορέας. Υπάρχουν πολλοί φορείς των φυτικών ιών, όπως: έντομα, νηματώδεις, μύκητες. Ακόμα, μετάδοση των ιών μπορεί να επιτευχθεί με το σπόρο, τη γύρη, με αγενές πολλαπλασιαστικό υλικό, με εμβολιασμό και με το φανερόγαμο παράσιτο κουσκούτα (Γεωργόπουλος 1984).

Ωστόσο, ο πιο συνήθης και ο πιο οικονομικής σημασίας τρόπος μεταδόσεως των ιών είναι με έντομα φορείς, και αυτό 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 (Κατής 2000).

Περισσότερα από το 70% των εντόμων-φορέων ανήκουν στην τάξη των Ημιπτέρων. Οι αφίδες (Οικογ. Aphididae) είναι οι σπουδαιότεροι φορείς

αυτής της τάξης. Ακολουθούν κατά σειρά σπουδαιότητας οι οικογένειες Jassidae (Cicadellidae), Membracidae και Delphacidae. Άλλα έντομα-φορείς είναι οι αλευρώδεις (Aleyrodidae), ορισμένα κοκκοειδή (Pseudococcidae), τα κολεόπτερα (Coleoptera) και οι θρίπτες (Thysanoptera). Από τις υπόλοιπες ομάδες Αρθροπόδων μόνο τα Ακάρεα (Τάξη Acarina – Οικογ. Eriophyidae), που ανήκουν στην κλάση Arachnida, είναι σημαντικοί φορείς ιών (Κατής 2000).

Συνήθως οι φορείς ενός ιού ανήκουν σε μια ταξινομική οικογένεια ή γένος, αν και, όπως συμβαίνει σε κάθε κανόνα, υπάρχουν και εξαιρέσεις. Ο ιός π.χ. της δακτυλιωτής κηλίδωσης του καπνού μεταδίδεται με θρίπτες, ακάρεα καθώς και με νηματώδεις (Κατής 2000).

Στη συνέχεια θα γίνει αναφορά στους σπουδαιότερους φορείς των ιώσεων, που όπως ειπώθηκε είναι οι αφίδες.

#### 1.4.1. Μετάδοση με αφίδες

Δύο συστήματα ταξινόμησης έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μετάδοση των ιών με έντομα. Το πρώτο βασίζεται στη χρονική διάρκεια που οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες, ενώ το δεύτερο βασίζεται στον τρόπο και τη θέση που βρίσκεται ο ιός στο έντομο κατά τη μετάδοση. Σύμφωνα με το πρώτο σύστημα που είναι και το παλαιότερο, οι ιοί που μεταδίδονται με αφίδες ταξινομούνται ως: (1) μη-έμμονοι, όταν οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες για λίγα λεπτά, και (2) έμμονοι, όταν οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες για όλη τη διάρκεια της ζωής τους (διατηρούν την ικανότητα μετάδοσης του ιού και μετά την έκδυση). Ο όρος ημι-έμμονος χρησιμοποιήθηκε αργότερα, για να καλύψει τις περιπτώσεις εκείνες, όπου τα έντομα παραμένουν ιοφόρα από μια έως μερικές μέρες. Αυτή η μέθοδος ταξινόμησης 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 (Κατής 2000).

Το δεύτερο σύστημα προτάθηκε από τους Kennedy *et al.* (1962) και έδωσε έμφαση στη θέση συγκράτησης του ιού στο φορέα. Σύμφωνα με αυτό, οι ιοί που μεταδίδονται με αφίδες ταξινομούνται ως φερόμενοι επί των στιλέτων ή ως κυκλοφορούντες. Στους φερόμενους επί των στιλέτων ιούς ανήκουν οι μη-έμμονοι, μικρός αριθμός των ημι-έμμονων ιών και μερικοί έμμονοι σύμφωνα με το προηγούμενο σύστημα ταξινόμησης. Οι κυκλοφορούντες ιοί περιλαμβάνουν την πλειονότητα των έμμονων ιών. Ο όρος κυκλοφορούντες αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία ο ιός προσλαμβάνεται με το μολυσμένο χυμό, απορροφάται διαμέσου του εντερικού τοιχώματος, μεταφέρεται στα υγιή φυτά. Οι κυκλοφορούντες ιοί, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται στο σώμα των αφίδων-φορέων, ονομάζονται κυκλοφορούντες-πολλαπλασιαζόμενοι ιοί. Το τρίτο σύστημα που προτάθηκε πρόσφατα, διαιρεί τους ιούς που μεταδίδονται με έντομα σε δύο κατηγορίες: στους μη-κυκλοφορούντες, που περιλαμβάνει τους μη-έμμορους και ημι-έμμορους, και στους κυκλοφορούντες, όπου περιλαμβάνονται μόνον οι έμμονοι. Οι κυκλοφορούντες υποδιαιρούνται στους κυκλοφορούντες-πολλαπλασιαζόμενους, κατηγορία που περιλαμβάνει τους ιούς που πολλαπλασιάζονται στο φορέα, και στους κυκλοφορούντες-μη-πολλαπλασιαζόμενους, που δεν πολλαπλασιάζονται στο φορέα. Ωστόσο, έχει επικρατήσει η χρήση των όρων μη-έμμονος, ημι-έμμονος και έμμονος ιός (Κατής 2000).

#### 1.4.1.1. 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 ιοί των γενών Potyvirus, Carlavirus, Caulimovirus (με το είδος *Myzus persicae*), Cucumovirus, Alfamovirus και Fabavirus. Τα γένη αυτά περιλαμβάνουν σφαιρικούς και νηματοειδείς ιούς, ιούς με DNA ή RNA γονιδίωμα, καθώς και ιούς με μονομερές, διμερές και τριμερές γονιδίωμα. Η μετάδοση μ' αυτόν τον τρόπο έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- i. Η πρόσληψη του ιού επιτυγχάνεται μετά από νύγματα δοκιμών των αφίδων στα ασθενή φυτά διάρκειας λίγων δευτερολέπτων ή λεπτών



(Κατής 2000). Οι αφίδες κάνουν πρόσληψη όχι μόνο μορίων του ιού, αλλά σε πολλές περιπτώσεις και μιας ιογενούς κωδικοποιημένης «βοηθητικής πρωτεΐνης», η οποία προσκολλάται στα σιλέτα. Προτάθηκε ότι η βοηθητική πρωτεΐνη που είναι παρούσα σε αρκετές ομάδες των μη έμμονων ιών ενεργεί ως μια γέφυρα ανάμεσα στα ισωμάτια και στις περιοχές συγκράτησης των σιλέτων. Τα νύγματα δοκιμών που είναι υπεύθυνα για την μετάδοση του μη έμμονου ιού μπορεί να καταγραφούν και να γίνουν ορατά, χρησιμοποιώντας τη συσκευή EPG. Με αυτή την τεχνική, διακρίνονται τρεις δευτερεύουσες φάσεις II-1, II-2 και II-3. Η πρόσληψη του ιού γίνεται στην δευτερεύουσα φάση II-3 (Feres 2001).

- ii. Τα ιοφόρα άτομα έχουν τη δυνατότητα άμεσης μετάδοσης του ιού (δεν απαιτείται λανθάνουσα περίοδος) σε υγιή φυτά μετά από νύγματα δοκιμών, διάρκειας λίγων δευτερολέπτων ή λεπτών.

Ο μηχανισμός της απελευθέρωσης του ιού απ' την αφίδα δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Έχουν προταθεί δύο διαφορετικές υποθέσεις για να εξηγήσουν τη διαδικασία της μετάδοσης του μη έμμονου ιού με αφίδες.

A. Η υπόθεση ingestion – egestion (Harris 1977).

Ο Harris πρότεινε ότι, οι αφίδες θα μπορούσαν να αποβάλουν από τον πεπτικό σωλήνα τον κυτταρικό χυμό που προηγούμενα είχε εισέλθει μέσα σε αυτόν και έτσι να εκβάλουν συγχρόνως και τα ισωμάτια. Πρότεινε δηλαδή ότι, η αντλία του cibarium της αφίδας μπορεί και λειτουργεί και προς τις δύο κατευθύνσεις, είτε για την κατάποση είτε για την αποβολή. Έτσι, οι αφίδες μπορούν κατά τη διαδικασία πρόσληψης της τροφής, να αντιστρέψουν τη ροή της αντλίας και να μεταδώσουν τον ιό στα φυτά.

B. Μια εναλλακτική υπόθεση, στηρίζεται στην έκκριση σιέλου.

Οι Martin *et al.* (1997), χρησιμοποιώντας τη συσκευή EPG, ανέφεραν ότι η απελευθέρωση των μη έμμονων ιών, λαμβάνει χώρα στην δευτερεύουσα φάση II-1, της ενδοκυτταρικής διάτρησης με το σιλέτο. Κατά τη διάρκεια αυτής, παρατηρείται άφθονη έκκριση σιέλου, μέσω της οποίας μεταφέρονται μόρια του ιού στο κυττόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Τα ισωμάτια μπορούν και απελευθερώνονται με την έκκριση

σιέλου, επειδή οι τροφικοί και σιελοφόροι αγωγοί μέσα στα γναθικά σιλιέτα, συγκλίνουν και εκτείνονται περίπου 2-8 μm από την κορυφή. Η υπόθεση βασίζεται στο γεγονός ότι, οι αφίδες μεταδίδουν τους μη έμμονους ιούς πριν λάβει χώρα οποιαδήποτε κατάποση. Η αλληλουχία των γεγονότων έτσι όπως καταγράφεται σε συσκευή EPG, καταδεικνύει την έκκριση σιέλου ως πιθανότερο μηχανισμό εξήγησης της διαδικασίας μετάδοσης των μη έμμονων ιών, σε σχέση με την αποβολή της τροφής από τον πεπτικό σωλήνα (Harris & Harris 2001, Fereres & Collar 2001).

- iii. Οι αφίδες διατηρούν τη μολυσματικότητα για λίγα λεπτά έως μερικές ώρες μετά την απομάκρυνσή τους από το ασθενές φυτό. Γι' αυτό οι μεταδιδόμενοι μ' αυτόν τον τρόπο ιοί ονομάζονται μη-έμμονοι.
- iv. Οι μη-έμμονοι ιοί μεταφέρονται στα στοματικά μόρια των εντόμων και δεν πολλαπλασιάζονται στους ιστούς του φορέα. Συγκεκριμένα ο ιός συγκρατείται στα σιλιέτα της αφίδας και δεν εισέρχεται στο μεσοέντερο του φορέα, γι' αυτό οι αφίδες χάνουν την ιοφόρα ικανότητα μετά την έκδυση (Κατής 2000).

Η αποτελεσματικότητα μετάδοσης των μη-έμμονων ιών αυξάνεται, όταν τα έντομα υποβάλλονται σε νηστεία (για λίγα λεπτά ή μερικές ώρες), πριν τους επιτραπούν νύγματα δοκιμών σε μολυσμένα φυτά. Αρκετοί συγγραφείς πρότειναν διάφορες εξηγήσεις για το φαινόμενο. Οι Wang *et al.* (1996) πρότειναν την ύπαρξη μιας ουσίας που απενεργοποιεί τον ιό και ίσως μεταφέρεται με το σιέλο της αφίδας ή είναι παρών στο χυμό του φυτού και παραμένει στα σιλιέτα της αφίδας μετά την βρώση και συνεπώς θα απουσίαζε στις αφίδες που ήταν σε νηστεία πριν την πρόσληψη του ιού. Ο Harris (2001) πρότεινε ότι οι διαφορές συμπεριφοράς μπορεί να είναι υπεύθυνες για το παρατηρούμενο φαινόμενο. Συγκεκριμένα, έδειξε ότι η διατροφή θα μπορούσε να αποτρέψει τις αφίδες απ' την τυπική τους συμπεριφορά της δοκιμής του φυτού, που περιλαμβάνει σύντομα νύγματα με στόχο την επιλογή φυτού ξενιστή. Οι αφίδες που δεν νηστεύουν θα έδειχναν αντίθετα μια συμπεριφορά αναζήτησης φλοιώματος, πολύ λιγότερο πιθανή να καταλήξει στην πρόσληψη του ιού.

Η περιγραφόμενη επίδραση της νηστείας δεν φαίνεται να ισχύει για κάθε είδος αφίδας. Έχει αναφερθεί ότι υπάρχει τουλάχιστον ένα είδος αφίδας,

η αφίδα του λάχανου, η *Brevicoryne brassicae*, (Hemiptera, Aphididae), η οποία δεν παρουσιάζει αυτού του είδους τη συμπεριφορά. Η *B. brassicae* τείνει να τρέφεται συνεχώς για τουλάχιστον 5 λεπτά αμέσως μετά την νηστεία, ενώ η *M. persicae* κάνει αρκετά σύντομα νύγματα που διαρκούν περίπου 30 δευτερόλεπτα. Ωστόσο, άλλες εξηγήσεις που δεν έχουν σχέση με τη συμπεριφορά για την επίδραση της νηστείας πριν την πρόσληψη δεν θα πρέπει να αποκλείονται (όπως προτάθηκε απ' τους Wang & Pirone το 1996) (Feres & Collar 2001).

Τα νύγματα δοκιμών των εντόμων μετά από νηστεία, είναι συνήθως μικρής διάρκειας (δευτερολέπτων ή ολίγων λεπτών), πράγμα που ευνοεί την πρόσληψη των μη-έμμονων ιών. Επειδή η πρόσληψη, αλλά και η μετάδοση, των μη-έμμονων ιών από τις αφίδες-φορείς επιτυγχάνεται με σύντομα νύγματα δοκιμών 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 τη σχετικά εύκολη μετάδοσή τους μηχανικά (με χυμό) στο εργαστήριο.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι καθοριστικοί παράγοντες μεταδοτικότητας των ιών είναι η καψιδιακή πρωτεΐνη των ισοσωματίων και η βοηθητική πρωτεΐνη (Κατής 2000).

#### 1.4.1.2. Ημι-έμμονοι ιοί

Περίπου 15 ιοί μεταδίδονται με ημι-έμμοιο τρόπο. Απ' αυτούς οι καλύτερα μελετημένοι είναι ο ίκτερος των τεύτλων (BYV) και η τριστέσα των εσπεριδοειδών (CTV). Τα ισώματα του ιού του ίκτερου των τεύτλων εντοπίζονται στο φλοιώμα των ασθενών φυτών και προκαλούν ίκτερο των φύλλων των τεύτλων. Βασικά οι ιοί αυτοί είναι μη-έμμοιοι, με την έννοια ότι δεν κυκλοφορούν στο σώμα των εντόμων, αλλά τα έντομα-φορείς διατηρούν την ικανότητα μετάδοσης μέχρι 3 έως 4 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 έμμοιοι ιοί, οι ημι-έμμοιοι εντοπίζονται συνήθως 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. Η νηστεία των αφίδων πριν από τα νύγματα διατροφής στα μολυσμένα φυτά δεν αυξάνει την αποτελεσματικότητα μετάδοσης των ημι-έμμονων ιών. Δε μεταδίδονται μετά την έκδυση των αφίδων (Κατής 2000).

#### 1.4.1.3. Έμμονοι ιοί

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

- i. Για την πρόσληψη του ιού απαιτείται μεγάλης διάρκειας διατροφική δραστηριότητα στο μολυσμένο ξενιστή. Αν και μερικά είδη αφίδων μεταδίδουν έμμονους ιούς όταν τρέφονται στο μολυσμένο ξενιστή για 20 μόνο λεπτά, η αποτελεσματικότητα μετάδοσης αυξάνεται όταν ο χρόνος διατροφής κυμαίνεται από 6 έως 24 ώρες.
- ii. Απαιτείται μια λανθάνουσα περίοδος, μεγαλύτερη των 12 ωρών από την πρόσληψη του ιού από το φορέα μέχρι τη στιγμή που γίνεται μολυσματικός.
- iii. Τα έντομα διατηρούν την ικανότητα μετάδοσης των ιών τουλάχιστον για μία εβδομάδα ή, στις περισσότερες περιπτώσεις, για όλη τη διάρκεια της ζωής τους.
- iv. Τα ιοφόρα άτομα διατηρούν τη μολυσματικότητα και μετά την έκδυση, ένα χαρακτηριστικό που ονομάζεται «μετάδοση του ιού από στάδιο σε στάδιο» (Κατής 2000).

Οι έμμοιοι ιοί διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: σ' αυτούς, όπως ο ιός του κίτρινου νανισμού του κριθαριού (BYDV), που δεν πολλαπλασιάζονται στο φορέα και σε αυτούς που πολλαπλασιάζονται, όπως ο ιός του νεκρωτικού ίκτερου του μαρουλιού (LNIV). Κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας περιόδου οι έμμοιοι ιοί κυκλοφορούν στο σώμα των εντόμων. Η κυκλοφορία του ιού γίνεται από τα στοματικά μόρια στον πεπτικό σωλήνα, στην αιμολέμφο και καταλήγει στους σιελογόνους αδένες απ' όπου με το σάλιο εισάγεται κατά τη διατροφή στο υγιές φυτό (Κατής 2000).

Οι έμμονοι ιοί που πολλαπλασιάζονται στο φορέα ονομάζονται «πολλαπλασιαζόμενοι ιοί» και μερικές φορές μεταδίδονται με τα αυγά του φορέα στους απογόνους. Αυτός ο τρόπος μετάδοσης του ιού ονομάζεται «μετάδοση με τα αυγά» και αποδείχτηκε ότι συμβαίνει με τον ιό των κίτρινων νεύρων ενός είδους ζωχού (*Sonchus arvensis*) στο φορέα *Hyperomyzus lactucae* (Linnaeus) (Hemiptera, Aphididae) (Κατής 2000).

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, οι έμμονοι ιοί εμφανίζουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης στη σχέση τους με το φορέα. Καταρχήν, η μετάδοση των έμμονων ιών γίνεται μόνο από είδη αφίδων που ξενίζουν τον ξενιστή του ιού. Έτσι ο ιός του καρουλιάσματος της πατάτας (PLRV) μεταδίδεται από τα είδη *M. persicae*, *Aphis nasturtii* (Kaltenbach), *Myzus ascalonicus* (Doncaster), *Aphis fabae* (Scopoli) και *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera, Aphididae), που έχουν ως ξενιστή την πατάτα. Η αποτελεσματικότητα μετάδοσης δεν αυξάνεται όταν τα έντομα υποβληθούν σε νηστεία, πριν τραφούν στα ασθενή φυτά. Οι έμμονοι ιοί εντοπίζονται κυρίως στο φλοιώμα των φυτών και πιθανόν αυτός είναι ο λόγος που οι περισσότεροι δε μεταδίδονται μηχανικά με χυμό (Κατής 2000).

Πίνακας 1.4.1. Παραδείγματα ιών που μεταδίδονται με αφίδες (Κατής, 2000).

ΙΟΣ	ΦΟΡΕΑΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
Ευλογία της δαμασκηιάς ( <i>Plum pox virus</i> )	<i>Myzus persicae</i>	Μη-έμμονος
Μωσαϊκό της μηδικής ( <i>Alfalfa mosaic virus, AMV</i> )	<i>Myzus persicae</i>	-//-
Κοινό μωσαϊκό της φασολιάς ( <i>Bean common mosaic virus,</i> BCMV)	<i>Acyrtosiphum pisum</i> *	-//-
Κίτρινο μωσαϊκό της κοινής κολοκυθιάς ( <i>Zucchini yellow mosaic virus,</i> ZYMV)	<i>M. persicae</i>	-//-
Κίτρινο μωσαϊκό της φασολιάς ( <i>Bean yellow mosaic virus,</i> BYMV)	<i>A. pisum</i> *	-//-
Μωσαϊκό των τεύτλων ( <i>Beat mosaic virus, BtMV</i> )	<i>M. persicae</i> *	-//-
Μωσαϊκό της αγγουριάς ( <i>Cucumber mosaic virus,</i> CMV)	Διάφορα είδη	-//-
Μωσαϊκό με νανισμό του καλαμποκιού ( <i>Maize dwarf mosaic virus,</i> MDMV)	<i>Rhopalosiphum</i> <i>maydis</i>	-//-
Μωσαϊκό του μαρουλιού ( <i>Lettuce mosaic virus, LMV</i> )	<i>M. persicae</i> *	-//-
Αφιδομεταδιδόμενος ίκτηρος των κολοκυνθοειδών ( <i>Cucurbit aphid-borne</i> <i>yellow virus, CABYV</i> )	<i>Aphis gossypii,</i> <i>M. persicae</i>	έμμονος



Καρούλιασμα των φύλλων της πατάτας ( <i>Potato leafroll virus</i> , PLRV)	<i>M. persicae</i>	-//-
Κίτρινος νανισμός του κριθαριού ( <i>Barley yellow dwarf virus</i> , BYDV)	<i>Acythosiphum dirhodum</i> <sup>*</sup> , <i>M. persicae</i>	-//-
Νεκρωτικός ίκτερος του μαρουλιού ( <i>Lettuce necrotic yellows virus</i> , LNYV)	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	-//-
Ίκτερος των τεύτλων ( <i>Beet yellows virus</i> , BYV)	<i>M. persicae</i> <sup>*</sup>	Ημι-έμμονος
Τριτσέτσα ( <i>Citrus tristeza virus</i> , CTV)	<i>Toxoptera citricida</i>	-//-

<sup>\*</sup>Αναφέρεται μόνο ο πιο αποτελεσματικός φορέας του ιού.

## 1.5. Μηχανική μετάδοση των ιών

Η μετάδοση ενός ιού από ένα μολυσμένο σε ένα υγιές φυτό είναι μια διαδικασία θεμελιώδης για τη μελέτη των ιών και για το διαχωρισμό τους από άλλα μη-μεταδοτικά αίτια ασθενειών, όπως ελλείψεις θρεπτικών στοιχείων ή δυσμενείς επιδράσεις παραγόντων του περιβάλλοντος.

Η μηχανική μετάδοση, είναι μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει δυο στάδια. (α) Επιτυχή εξαγωγή του ιού από τον μολυσμένο φυτικό ιστό μέσω λειοτριβήσης και

(β) Μεταφορά και επάλειψη του μολυσματικού χυμού στην επιφάνεια των υγιών φυτών, έτσι ώστε ο ιός να εισχωρήσει στα κύτταρα (Κατής 2000).

Χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για την απομόνωση ιών από μολυσμένα φυτά αγρού και διατήρηση τους στο εργαστήριο. Χρησιμοποιείται επίσης, για την μετάδοση ιών σε φυτοδείκτες όπου η παρατήρηση των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων που προκαλούνται μπορεί να οδηγήσει στη διάγνωση και την ταυτοποίηση τους. Η ίδια μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό ιών από μεικτές μολύνσεις, όταν αυτοί προκαλούν διαφορετικά συμπτώματα στον ίδιο ξενιστή ή μολύνουν διαφορετικούς ξενιστές. Τέλος οι μηχανικές μολύνσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δοκιμές μολυσματικότητας, όπου η μολυσματική ικανότητα του ιού μετράται με τον αριθμό των τοπικών κηλίδων που προκαλούνται από το μόλυσμα στα φύλλα ειδικά επιλεγμένων ξενιστών. Με την μέτρηση της μολυσματικότητας μπορεί ακόμη να μελετηθεί η επίδραση πολλών παραγόντων στον ιό (Κατής 2000).

Η μέθοδος της μηχανικής μετάδοσης παρουσιάζει δυο σημαντικά μειονεκτήματα (α) ο χρόνος που απαιτείται για την εκδήλωση των συμπτωμάτων κυμαίνεται από 2-3 ημέρες έως και λίγες εβδομάδες και (β) η ανάγκη ύπαρξης θερμοκηπιακών εγκαταστάσεων για την συνεχή παραγωγή φυτοδεικτών και τη διατήρηση τους μετά τη μόλυνση για την ανάπτυξη συμπτωμάτων. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μεθόδου μπορεί να επηρεαστούν από πολλούς εξωτερικούς παράγοντες, όπως η πηγή και η προετοιμασία του μολύσματος, η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος καθώς και παράγοντες του περιβάλλοντος. Παρόλα αυτά, η μηχανική μετάδοση αποτελεί ακόμη και σήμερα βασικό «εργαλείο» στα χέρια

της σύγχρονης ιολογίας, ιδιαίτερα στην περίπτωση νέων ιών για τους οποίους δεν υπάρχουν άλλα διαγνωστικά εργαλεία (Κατής 2000).

### **1.5.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μηχανική μετάδοση με χυμό**

Η μηχανική μετάδοση με χυμό απαιτεί την επιτυχή εκχύλιση του ιού από τους ιστούς του μολυσμένου ξενιστή και την μεταφορά του μολυσμένου χυμού στην επιφάνεια του υγιούς ευπαθούς φυτοδείκτη σε τέτοια κατάσταση ώστε ο ιός να μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα. Έτσι τα κύτταρα του φυτοδείκτη θα πρέπει να φέρουν πληγές για την είσοδο του ιού και φυσικά να στηρίζουν τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη συμπτωμάτων της ασθένειας. Για να είναι επιτυχής η μηχανική μετάδοση ιδιαίτερη σημασία έχει η επιλογή του φυτικού ιστού που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του μολύσματος. Η κατανομή του ιού και η συγκέντρωση του μπορεί να ποικίλει μέσα στο φυτό ξενιστή και ιδιαίτερα όταν πρόκειται για ξυλώδεις ξενιστές. Στην περίπτωση αυτή συνίσταται η χρήση ριζιδίων σαν πηγή μολύσματος για την μηχανική μόλυνση. Επιπλέον, ο χυμός ορισμένων φυτών περιέχει συστατικά τα οποία παρεμποδίζουν την μετάδοση του ιού και η μετάδοση και κατανομή τους μπορεί να ποικίλει στα διάφορα φυτικά τμήματα. Έτσι πολυφαινόλες που εντοπίζονται κυρίως σε ξυλώδεις ξενιστές, αναστέλλουν την μόλυνση. Η συγκέντρωση των ουσιών αυτών παρουσιάζεται μειωμένη στις κορυφές των φύλλων, στα τμήματα του άνθους και ορισμένες φορές στις άκρες των ριζών σε φυτά που βρίσκονται στην περίοδο ανάπτυξης. Για την σωστή μόλυνση επιλέγονται νεαρά πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα με έντονα συμπτώματα τα οποία περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση ιού και μικρότερη ποσότητα αναστολέων (Κατής 2004).

Μετά την επιλογή του κατάλληλου φυτικού ιστού το μόλυσμα παρασκευάζεται με ομογενοποίηση του φυτικού τμήματος σε ένα γουδί με γουδοχέρι, (ψυγμένα εκ των προτέρων στο ψυγείο), με την βοήθεια του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Το διάλυμα αυτό αποβλέπει στην ασφαλή απελευθέρωση του ιού από τα φυτικά κύτταρα, καθώς και την προστασία του από φυτικούς μεταβολίτες και κυτταρικά κατάλοιπα που απελευθερώνονται κατά την ομογενοποίηση μαζί με τον ιό και μπορεί να προκαλέσουν την αδρανοποίηση του. Το ιονικό περιβάλλον του διαλύματος

που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση του μολύσματος είναι ιδιαίτερης σημασίας για την σταθερότητα, τη μολυσματικότητα και τη διαλυτότητα των φυτικών ιών. Η μολυσματικότητα των περισσότερων ιών μειώνεται σε όξινο περιβάλλον. Το διάλυμα μόλυνσης διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία για να αποφευχθεί η απώλεια της μολυσματικότητας του ιού (Κατής 2004).

Κατά το στάδιο της μόλυνσης σημαντική είναι η δημιουργία επιφανειακών τραυμάτων που θα επιτρέψουν την είσοδο του ιού. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται πληγωτικές ουσίες όπως το Carborundum (silicon carbide) μεγέθους 300-600 mesh, με τα οποία επικονιάζουμε την επιφάνεια του φυτού που πρόκειται να μολυνθεί. Ακολουθεί η εφαρμογή του μολύσματος στο φυτό δέκτη που μπορεί να γίνει με την βοήθεια των δακτύλων μας, είτε με τη βοήθεια μιας γάζας ή ενός βαμβακοφόρου, είτε τέλος με ψεκασμό (Κατής 2004).

Για να είναι επιτυχής η μόλυνση απαραίτητη προϋπόθεση είναι η είσοδος του ιού από πληγές ή σπασμένες επιδερμικές τρίχες, ο πολλαπλασιασμός του στα επιδερμικά κύτταρα και η εισαγωγή του στο αγγειακό σύστημα για την αποίκηση και άλλων ιστών.

Για την εμφάνιση συμπτωμάτων του ιού στο φυτό δέκτη θα πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη

- (α) Γενετικοί παράγοντες του φυτού
- (β) Συνθήκες του περιβάλλοντος (φως, Θ°C)
- (γ) Φυσιολογική κατάσταση του φυτού κατά την μόλυνση

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η ευπάθεια των φυτών αυξάνεται όταν πριν από την μόλυνση αυτά τοποθετηθούν στο σκοτάδι για περίπου μία έως δυο μέρες (Κατής 2004).

## 1.6. Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay, 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, καθώς και για την αναγνώριση γραμμών καθίζησης σε δοκιμές ανοσοδιάχυσης. Ως ορολογική διαγνωστική μέθοδος το 1977 εισήχθη για πρώτη φορά η ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA, η οποία στη συνέχεια εφαρμόστηκε για την ανίχνευση μεγάλου αριθμού ιών (αντιγόνων). Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την ταυτοποίηση σοβαρών παθογόνων του ανθρώπου και των ζώων, ενώ από το 1977 άρχισαν οι εφαρμογές στη φυτοπαθολογία, αρχικά για τη διάγνωση ιών και αργότερα για τη διάγνωση και άλλων φυτοπαθογόνων, όπως βακτήρια, μύκητες και φυτοπλάσματα (Κατής 2004).

Στην ELISA χρησιμοποιείται αντιορός με αντισώματα που αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο ιό (αντιγόνο). Με την ανίχνευση του συμπλόκου αντισώματος και του ομόλογου αντιγόνου συμπεραίνεται η ύπαρξη του ιού στο δείγμα. Για την εξαγωγή αξιόπιστων και επαναλήψιμων συμπερασμάτων σε κάθε ορολογική δοκιμή περιλαμβάνονται δύο δείγματα (μάρτυρες) γνωστής αντίδρασης (ένα θετικό και ένα αρνητικό) (Κατής 2004).

Ακόμη και σήμερα, παρ' όλη την ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών μεθόδων μεγάλης ακρίβειας και ευαισθησίας, η ορολογική δοκιμή (ELISA) παραμένει η πλέον διαδεδομένη μέθοδος τόσο για διαγνώσεις ρουτίνας όσο και για ερευνητικούς σκοπούς, γιατί παρουσιάζει τα παρακάτω πλεονεκτήματα:

1. υψηλή ευαισθησία, με δυνατότητες ανίχνευσης πολύ μικρών ποσοτήτων (συνήθως 1-10 ng/ml) αντιγόνου (ιού),
2. ταχεία λήψη αποτελεσμάτων. Συνήθως είναι διαθέσιμα μέσα σε 6-24 ώρες,
3. δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων,
4. μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε εκχύλισμα φυτών, όσο και σε καθαρά παρασκευάσματα ιών,

5. εξειδίκευση, για τη διαφοροποίηση οροτύπων ενός ιού,
6. μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση «τεμαχισμένων» αλλά και άθικτων ιοσωματίων,
7. δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού του αντιγόνου (ιού) στο υπό εξέταση δείγμα,
8. δυνατότητα αυτοματοποίησης και παραγωγής kit (αυτόματο πλύσιμο των μικροπλακών, ταυτόχρονη διανομή των αντιδραστηρίων σε όλα τα φρεάτια, κ.λ.π.),
9. χαμηλό κόστος και διατήρηση των αντιδραστηρίων για μεγάλο χρονικό διάστημα,
10. δεν απαιτείται ιδιαίτερα ακριβός εργαστηριακός εξοπλισμός και
11. χρήση μικρών ποσοτήτων αντισωμάτων και αντιορού.

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

Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι της ανοσοενζυμικής δοκιμής ELISA, οι κυριότεροι των οποίων είναι η άμεση και η έμμεση (Κατής 2004).

### 1.6.1. Κατηγορίες άμεσης ELISA

#### 1.6.1.1. Άμεση DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Method – ELISA)

Είναι ο τύπος της δοκιμής που περιγράφηκε από τους Clark & Adams (1977) και σήμερα είναι ο πιο διαδεδομένος. Η ELISA γίνεται σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 φρεατίων. Τα διάφορα στάδια της άμεσης (Double Antibody Sandwich, DAS) ELISA είναι τα εξής:

- Τα φρεάτια της μικροπλάκας καλύπτονται αρχικά με γ-ανοσοσφαιρίνη (IgG) που έχει απομονωθεί (καθαρισθεί) για το σκοπό αυτό από τον αντιορό.
- Ακολουθεί επώαση για 2-4 ώρες στους 37 °C και μετά ξέπλυμα με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα.
- Προσθήκη οροαλβουμίνης (Αλβουμίνης ορού από βοοειδή, Bovine serum albumin, BSA) αμέσως μετά το πρώτο στάδιο για την αποφυγή μη εξειδικευμένων αντιδράσεων, με αποτέλεσμα στο επόμενο στάδιο



της δοκιμής να δεσμεύεται το αντιγόνο (δείγμα) σύμφωνα μόνο με την ειδική αντίδραση αντιγόνου / αντισώματος.

- Προσθήκη του ομογενοποιημένου με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, δείγματος και επώαση της μικροπλάκας όλη τη νύχτα στους 4 °C.
- Την επόμενη μέρα, ξέπλυμα της μικροπλάκας, τοποθέτηση της συζευγμένης γ-ανοσοσφαιρίνης και επώαση για 2-4 ώρες στους 37 °C.
- Μετά το τέλος της επώασης ξέπλυμα και προσθήκη του ανάλογου υποστρώματος, το οποίο εξαρτάται από το ένζυμο με το οποίο έχει γίνει η σήμανση της γ-σφαιρίνης.

Στα φρεάτια όπου είχαν τοποθετηθεί θετικά δείγματα εμφανίζεται χρώμα λόγω υδρόλυσης του υποστρώματος από το συζευγμένο ένζυμο. Για τη σύζευξη της γ-σφαιρίνης χρησιμοποιείται συνήθως το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση και η αναγνώρισή του γίνεται από το υπόστρωμα p-nitrophenylphosphate. Για να εμφανιστεί το κίτρινο χρώμα πρέπει να υπάρξει διαδοχική σε κάθε στάδιο αναγνώριση / σύνδεση των αντισωμάτων με τα ομόλογα αντιγόνα. Σε αυτή μόνο την περίπτωση θα υπάρξει κατά το τελευταίο στάδιο η αλκαλική φωσφατάση που καταλύει το «σπάσιμο» των φωσφοδιεστερικών δεσμών του υποστρώματος (κίτρινο χρώμα). Η εκτίμηση της έντασης του χρώματος μπορεί να καταγραφεί με ειδικό φωτόμετρο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.1, (ποσοτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων) ή να εκτιμηθεί από τον ερευνητή (ποιοτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων). Η υδρόλυση του υποστρώματος συνήθως αναστέλλεται με προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου ή θειϊκού οξέος στα φρεάτια της μικροπλάκας πριν από τη μέτρηση της έντασης του χρώματος (Κατής 2004).



**Εικόνα 1.6.1.** Ειδικό φωτόμετρο για την ποσοτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων της ELISA (Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας).

Η άμεση ELISA έχει δύο μειονεκτήματα:

1. Μπορεί να είναι τόσο εξειδικευμένη, ώστε αντισώματα εναντίον μιας φυλής να μην αναγνωρίζουν άλλη φυλή του ίδιου ιού. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι αρκετά χρήσιμο για τη διαφοροποίηση φυλών, αλλά αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα, όταν στόχος της εργασίας είναι η ανίχνευση όλων των οροτύπων ενός ιού. Η υψηλή εξειδίκευση είναι σχεδόν σίγουρο ότι οφείλεται στο γεγονός ότι η ύπαρξη του ενζύμου με το αντίσωμα αλληλεπιδρά με ασθενείς αντιδράσεις με φυλές που δεν είναι στενά συγγενικές.
2. Απαιτεί για την εκτέλεσή της την προετοιμασία για κάθε ιό νέου συζεύγματος ενζύμου-αντισώματος (Κατής 2004).

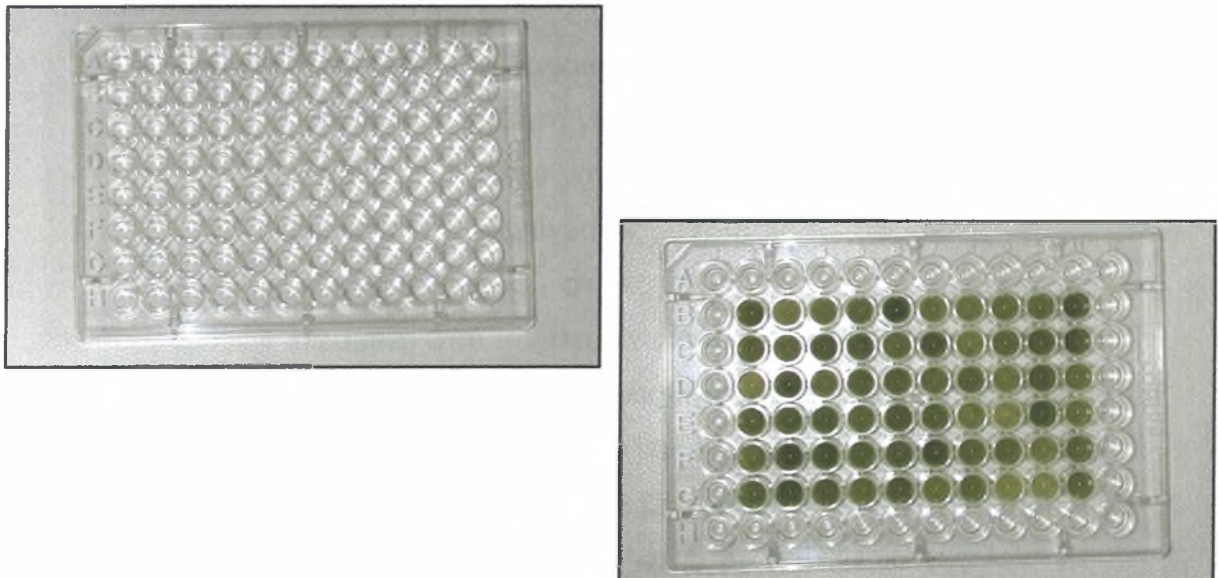
#### 1.6.1.2. Άμεση ACP-ELISA (Antigen Coated Plated ELISA)

Είναι ο ίδιος τύπος που περιγράφηκε παραπάνω με τη μόνη διαφορά ότι στο πρώτο στάδιο αντί της γ-σφαιρίνης προσκολλάται στα φρεάτια το

αντιγόνο. Η ACP-ELISA (Antigen Coated Plated ELISA) γίνεται επίσης σε μικροπλάκες πολυστυρενίου. Τα διάφορα στάδιά της είναι τα εξής:

- Τα φρεάτια της μικροπλάκας καλύπτονται αρχικά με αντιγόνο (πρωτεΐνη του ιού μέσα στο ομογενοποιημένο δείγμα).
- Ακολουθεί επώαση για 2-4 ώρες στους 37 °C και μετά ξέπλυμα με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα.
- Προστίθεται επίσης οροαλβουμίνη (Bovine serum albumin, BSA) αμέσως μετά το πρώτο στάδιο για την αποφυγή μη ειδικών αντιδράσεων.
- Ακολουθεί η προσθήκη γ-σφαιρίνης συζευγμένης με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση και επώαση της μικροπλάκας όλη νύχτα στους 4 °C .
- Την επομένη, ξέπλυμα της μικροπλάκας και προσθήκη του υποστρώματος p-nitrophenylphosphate .

Στα φρεάτια όπου είχαν τοποθετηθεί θετικά δείγματα εμφανίζεται χρώμα λόγω υδρόλυσης του υποστρώματος από το συζευγμένο ένζυμο (Κατής 2004).



**Εικόνα 1.6.2.** Μικροπλάκα που χρησιμοποιείται στην ανοσοενζυμική δοκιμή DAS-ELISA αριστερά και δεξιά μικροπλάκα στην οποία έχει γίνει προσθήκη του υπό εξέταση φυτικού δείγματος.

### 1.6.2. Έμμεση ELISA (Indirect ELISA)

Στην έμμεση ELISA (Indirect ELISA), το ένζυμο που χρησιμοποιείται για την τελική ανίχνευση του αντιγόνου, είναι συζευγμένο σε ένα αντίσωμα. Έτσι αν π.χ. η παραγωγή των αντισωμάτων εναντίον του ιού έγινε σε ποντίκι, μια αντι-ποντίκι ανοσοσφαιρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Η αντι-ποντίκι σφαιρίνη μπορεί να παραχθεί σε κατσίκα που αναγνωρίζει ως ξένη ουσία την πρωτεΐνη του ποντικιού που εισήχθη μέσω ένεσης στην κατσίκα.

Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ένα και μοναδικό σύζευγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για όλους τους ιούς και όλοι οι ορότυποι ενός ιού μπορούν να ανιχνευτούν με αντισώματα εναντίον μιας μόνο φυλής.

Τα στάδια της έμμεσης ELISA είναι τα παρακάτω:

- Τα φρεάτια καλύπτονται αρχικά από γ-ανοσοσφαιρίνες κουνελιού (IgG) (σε συγκέντρωση 1-10 ng/ml) έναντι του υπό εξέταση ιού (εξειδικευμένο αντίσωμα).
- Ακολουθεί επώαση στους 37 °C .
- Πλύσιμο της μικροπλάκας και επώαση στους 4 °C με το αντιγόνο (ιό)
- Προσθήκη ανοσοσφαιρινών που παρασκευάστηκαν σε ποντίκι και επώαση για 2-4 ώρες στους 37 °C.
- Επανάληψη πλυσίματος της μικροπλάκας και στη συνέχεια προσθήκη συζεύγματος αντί-ποντίκι σφαιρίνης, η οποία παρασκευάστηκε σε κατσίκα και ανοσοποιήθηκε με γ-σφαιρίνη από ποντίκι. Επώαση για 2-4 ώρες στους 37 °C .
- Τέλος, ακολουθεί η προσθήκη του ειδικού υποστρώματος, που υδρολύει το ένζυμο και δίνει χρώμα.

Οι κατηγορίες της έμμεσης ELISA είναι δύο. Η ACP-ELISA και η TAS-ELISA. Τα βήματα που ακολουθούνται κατά τη διαδικασία της ACP-ELISA είναι τα εξής: επίστρωση με φυτικό εκχύλισμα (ιός), προσθήκη πολυκλωνικού αντισώματος, προσθήκη συζεύγματος αντισφαιρίνης κουνελιού και προσθήκη υποστρώματος. Για την εκτέλεση της TAS-ELISA τα στάδια που λαμβάνουν χώρα είναι: επίστρωση με ειδικό αντίσωμα, προσθήκη δείγματος (ιού),

προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος, προσθήκη συζεύγματος αντισφαιρίνης ποντικίου και προσθήκη υποστρώματος (Κατής 2004).

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. Εισαγωγή

Ο ιός Υ της πατάτας (*Potato virus Y*, PVY) ανήκει στο γένος *Potyvirus* της οικογένειας *Potyviridae*. Αποτελεί σοβαρό ιό πολλών καλλιεργειών. Κυρίως μολύνει φυτά της οικογένειας *Solanaceae*, όπως καπνό, τομάτα, πιπεριά, πατάτα, αλλά και κάποια είδη των οικογενειών: *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae* και *Leguminosae*. Προκαλεί ποιοτικές αλλά και ποσοτικές ζημιές. Στην καλλιέργεια της πατάτας για παράδειγμα, έχουν αναφερθεί απώλειες στην σοδειά της τάξεως του 10 – 80% (Walsh *et al.* 2000).

Σε συνθήκες αγρού μεταδίδεται με μηχανικό τρόπο αλλά κυρίως με τους φυσικούς φορείς του, τις αφίδες, κατά μη έμμονο τρόπο. Αποκτιέται δηλαδή από τους φορείς, κατά την διάρκεια μικρών και επιφανειακών νυγμάτων δοκιμής λίγων δευτερολέπτων και γίνεται αμέσως μεταβιβάσιμος μετά την πρόσληψη, χωρίς να απαιτείται χρόνος εκκόλαψης. Οι αφίδες διατηρούν την μολυσματικότητα για λίγα λεπτά έως μερικές ώρες μετά την απομάκρυνσή τους από το ασθενές φυτό (Perez 1995).

Σύμφωνα με αναφορές στη βιβλιογραφία, τουλάχιστον 53 διαφορετικά είδη αφίδων συμβάλουν στην εξάπλωση του PVY. Το είδος *Myzus persicae* (Sulzer) αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό φορέα, ακολουθούμενο από το είδος *Aphis gossypii* (Glover) και το *Acyrtosiphon pisum* (Harris), (Perez 1995).

Η διαφοροποίηση της μολυσματικής ικανότητας μεταξύ των ειδών, οφείλεται κυρίως στη διαφορετική συχνότητα πραγματοποίησης επιφανειακών νυγμάτων. Οι Powell *et al.* (1992) διαπίστωσαν μια θετική σχέση ανάμεσα στη συχνότητα των ενδοκυτταρικών διεισδύσεων και τη μετάδοση του ιού Υ της πατάτας. Τα είδη των αφίδων που αποικίζουν μια καλλιέργεια, δείχνουν μια τυπική, πρώιμη συμπεριφορά δοκιμής κυτταρικού χυμού, προς εύρεση της κατάλληλης θέσης επί του ξενιστή. Αντίθετα, τα είδη που δεν αποικίζουν την καλλιέργεια, έχουν μια τάση να κινούνται κατά μήκος των φύλλων. Αλλά και όταν πραγματοποιούν νύγματα, αυτά είναι πολύ σύντομα χωρίς να λαμβάνει χώρα η διαδικασία της κατάποσης και συνεπώς οι πιθανότητες για πρόσληψη και κατ' επέκταση για μετάδοση του ιού, είναι πολύ μικρές (Fereses & Collar 2001). Η παραπάνω συμπεριφορά είναι απόρροια του υψηλού βαθμού

εξειδίκευσης που παρουσιάζουν οι αφίδες, σχετικά με την επιλογή του ξενιστή τους (Eastop 1973).

Ο ξενιστής προσεγγίζεται από τις αφίδες, αρχικά από το χρώμα και το άρωμα του. Στη συνέχεια, μετά την επαφή της αφίδας με το φυτό, καθοριστική σημασία έχουν τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του φυτού (ανατομικά ή χημικά) και το φλοιώμα.

Πειραματικά δεδομένα, καταδεικνύουν το φυτό του καπνού *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), ως τον κύριο ξενιστή του είδους *M. persicae*. Τα πτερωτά άτομα διακρίνουν τον ξενιστή τους, λίγο μετά την επαφή τους με αυτόν. Καθοριστικοί παράγοντες αυτής της διάκρισης είναι τα φυσικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας του φυτού αλλά και χημικές ουσίες που εντοπίζονται εκεί ή στην υποδερμίδα. Ωστόσο, η ικανότητα διάκρισης διαφέρει για τα δύο τάξα του *M. persicae*, *M. persicae nicotianae* και *M. persicae sensu stricto* (s. str.). Τα πτερωτά *M. persicae nicotianae* έχουν υψηλότερη ικανότητα διάκρισης ή εξειδίκευσης στον καπνό απ' ό τι τα *M. persicae* s. str. Ο γονότυπος του καπνού φαίνεται ότι παρέχει το βέλτιστο συνδυασμό για τα πτερωτά *M. persicae nicotianae*, τα οποία σύντομα τον αναγνωρίζουν ως ξενιστή και δημιουργούν εκεί αποικίες. Αντίθετα, το τάξο *M. persicae* s. str. είναι εξαιρετικά πολυφάγο και προσβάλλει τόσο τον καπνό όσο και άλλους δευτερεύοντες ξενιστές (Margaritoroulos *et al.* 2005).

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

Στη συγκεκριμένη μελέτη, ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα μετάδοσης της νεκρωτικής φυλής του ιού PVY από πτερωτά άτομα της αφίδας *M. persicae* τα οποία συλλέχθηκαν από ροδακινιές δυο διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών. Μορφομετρικές και μοριακές μελέτες στον πληθυσμό της *M. persicae*, των δύο αυτών περιοχών, της Ελλάδας. Από την περιοχή της Μελίκης, του νομού Ημαθίας και του Βελεστίνου, του νομού Μαγνησίας. Τα πτερωτά που προέρχονται από την Μελίκη, ανήκουν στο τάξο *M. persicae nicotianae* ενώ αυτά που προέρχονται από το Βελεστίνο, στο *M. persicae sensu stricto* (*s. str.*).

### 2.1. Ανάπτυξη φυτών καπνού

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού δυτικού τύπου της ποικιλίας Βιρτζίνια Ε9 (VE9). Τη συγκεκριμένη ποικιλία σπόρου διέθεσε ο Καπνικός Σταθμός Έρευνας και Κέντρο Διανομής Σπόρων Κατερίνης. Αρχικά γινόταν σπορά στο σπορείο. Για σπορείο χρησιμοποιήθηκαν ατομικά στρόγγυλα γλαστήρια τα οποία περιείχαν ως εδαφικό υπόστρωμα, τύρφη «Primo» (Plantaflo, Germany). Κατόπιν τα φυτά καπνού μεταφυτεύονταν σε ειδικούς δίσκους φύτευσης όταν βρίσκονταν στο στάδιο των δύο πρώτων πραγματικών φύλλων. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε εντομοστεγή ορθογώνια κλουβιά (Εικόνα 2.2.) προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση από άτομα αφίδων. Δυο με τρεις μέρες μετά την μεταφύτευση τα φυτά καπνού ήταν έτοιμα για αφιδομετάδοση.



**Εικόνα 2.1.** Δίσκοι με φυτά καπνού.



**Εικόνα 2.2.** Εντομοστεγές κλουβί διατήρησης των φυτών καπνού, προς αποφυγή επιμόλυνσης.

## **2.2 Συντήρηση του ιού**

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η νεκρωτική φυλή 304 του ιού Υ της πατάτας, την οποία διέθεσε το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Η συντήρηση της συγκεκριμένης φυλής έγινε σε φυτά καπνού της ποικιλίας

Βιρτζίνια E9 (VE9). Για την διατήρηση του ιού χρησιμοποιήθηκε η εργαστηριακή μετάδοση αυτού και συγκεκριμένα η μηχανική μετάδοση. Πρόκειται για μια διεργασία κατά την οποία πραγματοποιείται λειοτρίβηση ενός τμήματος μολυσμένου φυτικού ιστού περίπου 0,5-1,0 gr, για εξαγωγή μολυσματικού χυμού. Ακολουθεί επάλειψη των φύλλων που επρόκειτο να μολυνθούν με την πληγωτική ουσία Carborundum (600 mesh), προς δημιουργία επιφανειακών τραυμάτων που επιτρέπουν την είσοδο του ιού, και εφαρμογή του μολύσματος με τη βοήθεια των δακτύλων μας. Ευνόητη είναι η χρήση γαντιών προς αποφυγή επιμολύνσεων.

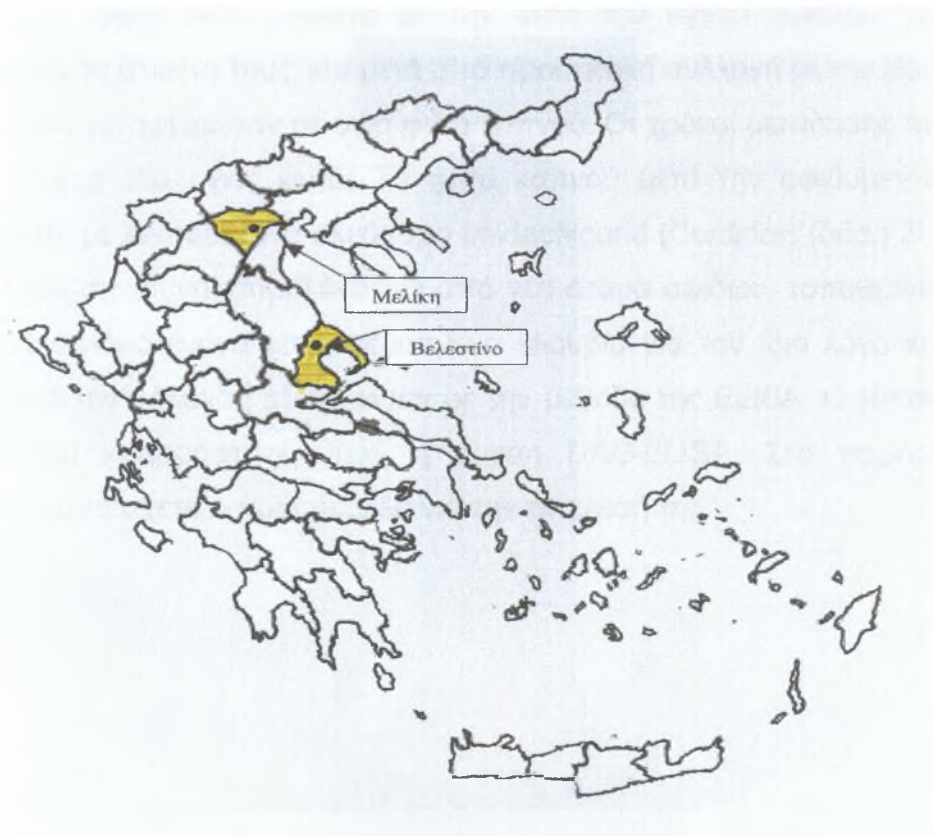
Η παραπάνω διεργασία επαναλήφθηκε αρκετές φορές κατά τη διάρκεια του πειράματος. Συγκεκριμένα, γινόταν μετάδοση του ιού σε νέα, υγιή φυτά καπνού πριν το γήρας των μολυσμένων, επιτυγχάνοντας έτσι την διατήρηση του ιού. Στο παράρτημα παρατίθεται το σχετικό πρωτόκολλο για την εκτέλεση των μηχανικών μολύνσεων.

### 2.3. Συλλογή αφίδων

Για την εκτέλεση του πειράματος πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για την μαζική συλλογή πτερωτών ατόμων του *Myzus persicae* (Sculzer) από δένδρα ροδακινιάς. Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες ήταν από 25 Απριλίου 2004 έως 12 Ιουνίου 2004. Συλλογή πτερωτών ατόμων έγινε από δυο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.3.). Από την περιοχή της Μελικής στον νομό Ημαθίας (Βόρεια Ελλάδα) και από το Βελεσίνο στο νομό Μαγνησίας (Κεντρική Ελλάδα). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν επτά δειγματοληψίες για κάθε μια από τις περιοχές που προαναφέρθηκαν. Οι δειγματοληψίες γίνονταν κάθε φορά από διαφορετικά χωράφια της ίδιας περιοχής. Από κάθε χωράφι συλλέγονταν περίπου 13-15 δείγματα που αποτελούνταν από 3-4 κλαδιά ροδακινιάς. Το κάθε δείγμα μετά την συλλογή του τοποθετούνταν σε ειδικό αεροστεγές σακουλάκι δειγματοληψίας μαζί με απορροφητικό χαρτί. Τα δείγματα τοποθετούνταν στην συνέχεια σε φορητό ψυγείο μικρού μεγέθους, με παγοκύστες για την καλύτερη διατήρησή τους μέχρι τη μεταφορά στο εργαστήριο.



Η συντήρηση των δειγμάτων στο εργαστήριο γινόταν σε ειδικά εντομοστεγή κλουβιά διαστάσεων (40 X 50 X 47) cm όπου τοποθετούνταν τα κλαδιά ροδακινιάς μέχρι να παραχθούν ενήλικα πτερωτά άτομα. Μέσα στα κλουβιά, τα κλαδιά βρισκόταν σε δοχείο με νερό, με σκοπό την παράταση της διάρκειας ζωής τους. Γινόταν έλεγχος της ποσότητας του νερού τακτικά, και συμπλήρωση κάθε φορά που διαπιστωνόταν μείωση.



**Εικόνα 2.3.** Οι δύο γεωγραφικές περιοχές συλλογής των πτερωτών ατόμων του είδους *Myzus persicae* (Sulzer) στην Ελλάδα.

#### 2.4. Διαδικασία μετάδοσης PVY από πτερωτά άτομα

Μόλις εμφανίζονταν τα πρώτα πτερωτά άτομα στα κλουβιά συντήρησης των κλαδιών που προέρχονταν από τις δειγματοληψίες, ακολουθούσε προσεκτική συλλογή αυτών σε πλαστικά φιαλίδια με βιδωτό πώμα, με την βοήθεια υγρού πινέλου λεπτής βούρτσας No. 00, προς αποφυγή



τραυματισμού τους. Στη συνέχεια, γινόταν μεταφορά τους σε νέο κενό κλουβί όπου διατηρούνταν σε κατάσταση νηστείας για 10-12 περίπου ώρες. Η μεταφορά των πτερωτών ατόμων σε κενό κλουβί πραγματοποιούνταν περίπου στις 9 μ.μ το βράδυ της προηγούμενης ημέρας και η αφιδομετάδοση λάμβανε χώρα περίπου στις 9 π.μ την επόμενη μέρα. Κατά την διαδικασία της αφιδομετάδοσης τα πτερωτά άτομα μετά την περίοδο νηστείας μεταφέρονταν σε μολυσμένα φυτά καπνού προκειμένου να καταστούν ιοφόρα, ο χρόνος πρόσληψης του ιού ήταν 3 λεπτά. Στην συνέχεια οι αφίδες παρενοχλούνταν με ελαφρά τριβή στην ουρίτσα με την μύτη του υγρού πινέλου για να αποσύρουν τα σιλιέτα τους, και μετά από προσεκτική συλλογή με την βοήθεια του πινέλου μεταφέρονταν σε υγιή φυτά καπνού. Οι χρόνοι μετάδοσης ήταν 3 και 10 λεπτά στο υγιές φυτό. Τα φυτά καπνού μετά την αφιδομετάδοση ψεκάζονταν με εντομοκτόνο σκεύασμα imidachloprid (Confidor) (δόση 300μl / 1l H<sub>2</sub>O) για αποφυγή επιμολύνσεων από νέα άτομα αφίδων, τοποθετούνταν σε ειδικά αφιδοστεγανά κατασκευασμένα κλουβιά για τον ίδιο λόγο και 15 μέρες μετά την μόλυνση εξετάζονταν με την μέθοδο της ELISA. Ο τύπος της ELISA που εφαρμόστηκε, ήταν η άμεση DAS-ELISA. Στο παράρτημα παρατίθεται το σχετικό πρωτόκολλο για την εκτέλεσή της.

### 3. Αποτελέσματα

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων του πειράματος, έγινε χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το πακέτο Statistica version 6.0.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, κατέδειξε την *M. persicae* ως έναν αποτελεσματικό φορέα του ιού, καθώς το ποσοστό μετάδοσης του ιού στα φυτά καπνού, ανήλθε μέχρι και 37,6%, για το υποείδος *M. persicae nicotianae* (Πίνακας 3.1.).

**Πίνακας 3.1.** Ποσοστό ιωμένων φυτών καπνού που μολύνθηκαν από τον PVY μέσω πτερωτών ατόμων του *Myzus persicae*, τα οποία συλλέχθηκαν από την περιοχή της Μελίκης και του Βελεστίνου.

Ταξα (Περιοχή)	Ποσοστό (%) ιωμένων φυτών		
	Χρόνος πρόσληψης-μετάδοσης του ιού		$\chi_1^2$
	3' - 10'	3' - 3'	
<i>M. persicae nicotianae</i> (Μελίκη)	37,6 (N = 266)	33,2 (N = 226)	1,04 (P < 0.31)
<i>M. persicae sensu stricto</i> (Βελεστίνο)	35,7 (N = 286)	26,1 (N = 226)	5,35 (P < 0.02)
$\chi_1^2$	0.22 (P < 0.64)	2,72 (P < 0,99)	

Ο συνολικός αριθμός υγιών φυτών καπνού που χρησιμοποιήθηκαν για την μετάδοση του PVY<sup>N</sup> με άτομα του *Myzus persicae nicotianae* τα οποία συλλέχθηκαν από την περιοχή Μελίκη, ήταν 266. Μετά από εξέταση των συγκεκριμένων φυτών με την ανοσοενζυμική μέθοδο DAS-ELISA, αποδείχθηκε πως σ' ένα ποσοστό της τάξης του 37,6%, πραγματοποιήθηκε επιτυχής μετάδοση του ιού. Τα φυτά δηλαδή βρέθηκαν ιωμένα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η διάρκεια παραμονής της αφίδας στο μολυσμένο με τον ιό φυτό, ήταν τρία λεπτά ενώ ο χρόνος που η αφίδα είχε στην διάθεσή της για

πραγματοποίηση επιφανειακών νυγμάτων δοκιμασίας στα υγιή φυτά, ήταν δέκα λεπτά της ώρας.

Ομοίως, πτερωτά *M. persicae sensu stricto* τα οποία συλλέχθηκαν από την περιοχή του Βελεστίνου, χρησιμοποιήθηκαν για την μετάδοση του ιού σε 286 υγιή φυτά. Το ποσοστό μετάδοσης που καταγράφηκε σε αυτή την περίπτωση ήταν 35,7%.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε σε 226 φυτά καπνού, με άτομα του *M. persicae nicotianae*. Το ποσοστό των ιωμένων φυτών έφτασε το 33,2%. Σ' αυτήν την περίπτωση η αφίδα παρέμεινε στο ιωμένο φυτό αλλά και στο υγιές, είναι τρία λεπτά.

Τέλος, άτομα του *M. persicae s. str.*, χρησιμοποιήθηκαν για την μετάδοση του ιού πάλι σε 226 υγιή φυτά καπνού. Το ποσοστό των ιωμένων φυτών ανήλθε σε 26,1%, ενώ ο χρόνος παραμονής της αφίδας στο ιωμένο φυτό ήταν τρία λεπτά, όσο και ο χρόνος παραμονής στο υγιές φυτό.

Η στατιστική ανάλυση, για  $P < 0,05$ , έδειξε πως δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο ποσοστό μετάδοσης του ιού μεταξύ των πτερωτών *M. persicae nicotianae* και *M. persicae s. str.*, όταν ο χρόνος παραμονής στο ιωμένο φυτό ήταν τρία λεπτά και στο υγιές δέκα, ( $\chi^2=0,22$ ,  $P < 0,64$ ).

Το ίδιο αποτέλεσμα διαπιστώθηκε και όταν ο χρόνος που η αφίδα παρέμεινε στο ιωμένο φυτό ήταν τρία λεπτά, ίσως με το χρόνο παραμονής της στο υγιές. Δεν παρατηρήθηκαν δηλαδή στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο ποσοστό μετάδοσης του PVY<sup>N</sup> μεταξύ των πτερωτών *M. persicae nicotianae* και *M. persicae s. str.*, ( $\chi^2=2,72$ ,  $P < 0,99$ ).

Στατιστικώς σημαντικές διαφορές δεν καταγράφηκαν ούτε όταν διαφοροποιήθηκε ο χρόνος παραμονής της αφίδας στο υγιές φυτό καπνού. Συγκεκριμένα, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο ποσοστό μετάδοσης του ιού μέσω ατόμων *M. persicae*, τα οποία συλλέχθηκαν από τη Μελίκη και παρέμειναν στο υγιές φυτό δέκα λεπτά και αυτών που παρέμειναν τρία λεπτά, ( $\chi^2=1,04$ ,  $P < 0,31$ ).

Παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές όμως, στην περίπτωση που η χρονική διάρκεια παραμονής στα υγιή φυτά ατόμων του υποείδους *M. persicae s. str.* ήταν διαφορετική, ( $\chi^2=5,35$ ,  $P < 0,02$ ). Συγκεκριμένα τα πτερωτά που είχαν στην διάθεσή τους 10 λεπτά για να

πραγματοποιήσουν νύγματα δοκιμής στα υγιή φυτά καπνού, παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό μετάδοσης του ιού (35,7%) απ' τα πτερωτά που παρέμειναν μόλις τρία λεπτά (ποσοστό μετάδοσης ίσο με 26,1%).

#### 4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η *M. persicae*, σύμφωνα με αναφορές στη βιβλιογραφία, καταδεικνύεται ως αποτελεσματικός φορέας του ιού Υ της πατάτας. Αυτό επιβεβαιώθηκε από τη στατιστική ανάλυση και του συγκεκριμένου πειράματος. Η υψηλή μολυσματική ικανότητα της *M. persicae*, οφείλεται στον βαθμό εξειδίκευσης που παρουσιάζει το είδος στο φυτό του καπνού. Εξαιτίας αυτής της εξειδίκευσης, η συχνότητα πραγματοποίησης επιφανειακών νυγμάτων δοκιμασίας, είναι μεγάλη. Και όσο μεγαλύτερη είναι η συχνότητα των νυγμάτων, τόσο μεγαλύτερο και το ποσοστό μετάδοσης του PVY, όπως ειπώθηκε από τους Powel *et al.* (1992).

Προηγούμενες πειραματικές μελέτες αναφέρουν ότι, το υποείδος *M. persicae nicotianae* παρουσιάζει εξειδίκευση στο φυτό του καπνού, ενώ το *M. persicae sensu stricto* (*s. str.*) είναι εξαιρετικά πολυφάγο. Στηριζόμενος κάποιος σε αυτό θα μπορούσε να αναμένει μικρότερη μετάδοση του ιού από τα πτερωτά *M. persicae s. str.* Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα. Αντίθετα ο ιός μεταδόθηκε αποτελεσματικά, τόσο από τα πτερωτά *M. persicae nicotianae* όσο και από τα *M. persicae s. str.* Αυτό ίσως εξηγείται από το γεγονός ότι το τάξο *M. persicae s. str.* είναι πολυφάγο και κατά συνέπεια μπορεί να αποικίζει έναν λιγότερο κατάλληλο ξενιστή, όταν ο βέλτιστος δεν είναι άμεσα διαθέσιμος. Ωστόσο, λόγω έλλειψης εξειδίκευσης στον καπνό, τα πτερωτά *M. persicae s. str.* έχουν την τάση να κινούνται κατά μήκος του φύλλου αρχικά και στη συνέχεια να πραγματοποιούν ενδοκυτταρικές διατρήσεις, σε αντίθεση με τα πτερωτά του εξειδικευμένου υποείδους τα οποία μόλις έρθουν σε επαφή με το φυτό πραγματοποιούν νύγματα δοκιμής. Σε αυτή τη συμπεριφορά πιθανόν οφείλεται η ελάχιστη μικρότερη ικανότητά τους να μεταδίδουν τον ιό, σε σχέση με τα πτερωτά *M. persicae nicotianae*. Επίσης, αυτή η συμπεριφορά συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι τα πτερωτά της *M. persicae*, διακρίνουν τον ξενιστή τους λίγο μετά την επαφή τους με αυτόν, στηριζόμενα σε φυσικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας του φυτού καθώς και χημικές ουσίες που υπάρχουν εκεί, και όχι στις ενδοκυτταρικές διατρήσεις (Margaritoroulos *et al.* 2005).

Ο διαφορετικός χρόνος παραμονής των πτερωτών στα υγιή φυτά, δεν φαίνεται να επηρέασε το ποσοστό μετάδοσης του ιού από τις αφίδες *M. persicae nicotianae*. Τόσο τα πτερωτά που είχαν στην διάθεση τους δέκα λεπτά για να εμβολιάσουν τον ιό στα υγιή φυτά καπνού, όσο και αυτά που είχαν τρία λεπτά, μετέδωσαν το ίδιο αποτελεσματικά την νεκρωτική φυλή του PVY.

Αντίθετα, στατιστικώς σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μόνο στην περίπτωση που διαφοροποιήθηκε η χρονική διάρκεια παραμονής των πτερωτών *M. persicae s. str.* στα υγιή φυτά. Συγκεκριμένα, τα πτερωτά που παρέμειναν δέκα λεπτά στα υγιή φυτά καπνού, παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό μετάδοσης του ιού PVY, απ' αυτά που παρέμειναν μόλις τρία λεπτά. Καταγραφή των πρώτων λεπτών (1' - 5') της διατροφικής συμπεριφοράς των πτερωτών *M. persicae s. str.* σε συσκευή EPG (Electrical Penetration Graph), έδειξαν λιγότερες διατρήσεις στα επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού απ' ότι τα πτερωτά *M. persicae nicotianae* (Margaritopoulos *et al.* 2005). Κατά συνέπεια τα άτομα που παρέμειναν δέκα λεπτά στα υγιή φυτά, είχαν περισσότερο διαθέσιμο χρόνο για να πραγματοποιήσουν περισσότερα νύγματα δοκιμασίας στα φυτά και συνεπώς είχαν περισσότερες πιθανότητες να μεταδώσουν τον ιό, σε σχέση με τα άτομα που παρέμειναν τρία λεπτά.

Συνοπτικά, τα συμπεράσματα που διεξήχθησαν από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος, ήταν τα παρακάτω:

α) τα πτερωτά *M. persicae nicotianae* και *M. persicae s. str.*, αναγνωρίζουν γρήγορα το φυτό – ξενιστή, λίγο μετά την προσγγείωσή τους σε αυτό,

β) τα πτερωτά *M. persicae s. str.*, πραγματοποιούν λιγότερες διατρήσεις γιατί δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση στον καπνό, ωστόσο

γ) και το εξειδικευμένο και το πολυφάγο είδος μεταδίδουν αποτελεσματικά την νεκρωτική φυλή του PVY, και

δ) ο χρόνος που τα πτερωτά έχουν διαθέσιμο για να πραγματοποιήσουν νύγματα δοκιμασίας στα υγιή φυτά και κατά συνέπεια να μεταδώσουν τον ιό, επηρέασε το ποσοστό μετάδοσης στις αφίδες του πολυφάγου είδους.

Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα, με μεθόδους που προσεγγίζουν περισσότερο τις φυσικές συνθήκες στους αγρούς, χωρίς να στηρίζονται



αποκλειστικά στα χρονομετρημένα νύγματα δοκιμών, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα.

Τέλος, αξίζει να επισημανθεί η σημασία της παρουσίας των πτερωτών *M. persicae nicotianae* και *M. persicae s. str.* σε μια περιοχή όπου καλλιεργείτε καπνός. Η καταλληλότητα του καπνού ως ξενιστή, ιδιαίτερα για το υποείδος *M. persicae nicotianae*, έχει ως αποτέλεσμα την γρήγορη αύξηση του πληθυσμού των αφίδων. Το μεγάλο μέγεθος του πληθυσμού των αφίδων σε συνδυασμό με την μεγάλη μολυσματική ικανότητα που παρουσιάζουν και τις ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες που μπορεί να επικρατούν, συμβάλουν στην εκδήλωση επιδημίας. Συνεπώς, η μείωση της παραγωγής είναι αναπόφευκτη. Για τον περιορισμό των δυσμενών επιπτώσεων στην παραγωγή, απαιτείται η έγκαιρη εφαρμογή των κατάλληλων τεχνικών και μεθόδων που θα διατηρήσουν τον πληθυσμό των αφίδων κάτω από το επίπεδο οικονομικής ζημιάς. Μεγάλης σημασίας είναι και ο έλεγχος της μολυσματικής ικανότητας και άλλων ειδών αφίδων, που δεν έχουν ελεγχθεί ως φορείς του PVY, και τα οποία πιθανόν να έχουν αυτή την ικανότητα και να συμβάλουν με τη σειρά τους στην εξάπλωση και διαίωνιση του ιού.

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ**

## ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ

### ΥΛΙΚΑ:

1. Φυτό – δότης (απ' όπου προέρχεται το δείγμα)
2. Φυτοδείκτες
3. Γουδί και γουδοχέρι
4. Ρυθμιστικό διάλυμα (φωσφορικό 0,01M pH 7,0)
5. Carborundum (ανθρακοπυρίτιο)
6. Πιπέτες Pasteur
7. Υδροβολέας
8. Ταμπέλες και μολύβι

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

1. Σημειώνουμε τα φύλλα που πρόκειται να μολύνουμε.
2. Απλώνουμε στα φύλλα που πρόκειται να μολύνουμε, ένα λεπτό στρώμα Carborundum (600 mesh) χρησιμοποιώντας ένα πλαστικό δοχείο καλυμμένο με δικτυωτό ύφασμα (τούλι).
3. Λειοτριβούμε το μολυσμένο φυτικό ιστό (περίπου 0,5 – 1,0 g φυτικού ιστού, αραίωση 1/10 ή 1/100) χρησιμοποιώντας γουδί και ρυθμιστικό διάλυμα.
4. Με καθαρά χέρια παίρνουμε μια ποσότητα μολύσματος και στηρίζοντας την κάτω επιφάνεια του φύλλου του φυτοδείκτη που θέλουμε να μολύνουμε απλώνουμε απαλά το μόλυσμα στην επάνω επιφάνεια του.
5. Μετά από μερικά λεπτά ξεπλένουμε με νερό βρύσης τα φύλλα που μολύναμε.
6. Σημαίνουμε τα μολυσμένα φυτά, αναγράφοντας την ημερομηνία μόλυνσης, την προέλευση του μολύσματος (π.χ. καπνός, περιοχή) και τον ιό (εφόσον είναι γνωστός) ή τον κωδικό του δείγματος εφόσον δεν είναι γνωστός.
7. Πλένουμε τα χέρια μας με νερό και σαπούνι και μεταφέρουμε τα φυτά σε θάλαμο αναπτύξεως για ανάπτυξη συμπτωμάτων.

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ DAS ELIZA.

### ΒΗΜΑ 1<sup>0</sup>

1. Τοποθέτηση της γ-ανοσοσφαιρίνης σε διάλυμα COATING BUFFER (IgG).
2. Η αραίωση για την συγκεκριμένη γ- ανοσοσφαιρίνη είναι 1/333.
3. Επώαση για 3 ώρες στους 37 °C αφού καλύψουμε την μικροπλάκα με μεμβράνη.
4. πλύσιμο της μικροπλάκας 3 φορές επί 3 λεπτά με διάλυμα PBS-TWEEN.
5. ΠΡΟΣΟΧΗ: Γέμισμα μόνο των εξωτερικών πηγαδιών της μικροπλάκας. Τα εξωτερικά – περιφερειακά γεμίζονται πάντα με νερό για να γίνει ομοιόμορφα το ζέσταμα στο φούρνο.

### ΒΗΜΑ 2<sup>0</sup>

1. Διάλυμα λυοτρίβισης PBS-TWEEN.
2. Σε κάθε σακουλάκι με το απαραίτητο κομμάτι φύλλου, προσθήκη 1,5 ml από το PBS-TWEEN.
3. Διατηρώ τα σακουλάκια μέχρι την λυοτρίβιση αλλά και κατά τη διάρκεια αυτής σε πάγο.
4. Επιλογή φύλλου: το βάρος του λυοτριβομένου φύλλου είναι το 1/10 αυτού που αρχικά συλλέγω.
5. Πάντα βάζω ένα θετικό βοθρίο (αφυδατωμένη μορφή ή μόλυσμα από φρέσκο ιστό) και ένα τελείως καθαρό.
6. Τοποθέτηση της μικροπλάκας στο ψυγείο όλη τη νύχτα.

### ΒΗΜΑ 3<sup>0</sup>

1. Καλό ξέπλυμα της μικροπλάκας 3 φορές με διάλυμα PBS-TWEEN για να φύγει το πράσινο χρώμα. Επανάληψη 3 φορές.
2. Προσθήκη συζευμένης γ-ανοσοσφαιρίνης. Εφαρμόζουμε αραίωση όπως αρχικά, σε διάλυμα PBS-TWEEN.
3. Επώαση 3 ώρες στους 30 – 37 °C.
4. Καλό πλύσιμο της μικροπλάκας με διάλυμα PBS-TWEEN.

### ΒΗΜΑ 4<sup>0</sup>

1. SUBSTRATE BUFFER and PNPP.  
Παρασκευή: η αναλογία είναι πάντα 1mg/ml η παρανιτροφαινόλη στο buffer.
2. 10 ml substrate byffer προσθήκη παρανιτροφαινόλης ανάδευση.
3. Τοποθετώ 100 μ SUBSTRATE BUFFER σε κάθε βοθρίο, με πολυτιπέτα.
4. Με την παραπάνω διαδικασία παίρνει σε λίγο το κίτρινο χρώμα σε θερμοκρασία δωματίου.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ DAS ELISA.

Δ/ΜΑ PBS 10X

Δ/ΜΑ	250 ml	500 ml	750 ml	1000 ml	2000 ml
NaCL (gr)	20	40	60	80	160
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (gr)	3,6	7,15	10,75	14,3	28,6
KCL (gr)	0,5	1	1,5	2	4
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (gr)	0,5	1	1,5	2	4

Δ/ΜΑ Coating Buffer

Δ/ΜΑ	250 ml	500 ml	750 ml	1000 ml	2000 ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (gr)	0,3975	0,795	1,1925	1,59	3,18
NaHCO <sub>3</sub> (gr)	0,7325	1,465	2,1975	1,465	2,93



## Βιβλιογραφία

- Blackman, R. L.** (1971) Variation in the photoperiodic response within natural populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Bull. Entomol. Res.* **60**, 533-546.
- Blackman, R. L.** (1972) The inheritance of life-cycle differences in *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera, Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* **62**, 281-294.
- Blackman, R. L.** (1974) Life cycle variation in *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera, Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. *Bull. Entomol. Res.* **63**, 595-607.
- Blackman, R. L. & Eastop, V. F.** (1984) "*Aphids on the World's Crops: an Identification Guide*". Wiley-Interscience publication. Chichester. pp. 314.
- Bokx, J. A. & Huttinga H.** (1981) Potato virus Y. [http:// www.dpvweb.net](http://www.dpvweb.net).  
Ημερομηνία πρόσβασης: 7/9/2005.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. & Watson, L.** (1996) "Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database". Cab International.
- Brook, A. J.** (1968) The effect of plant spacing on the numbers of aphids trapped over the groundnut crop. *Ann. Appl. Biol.* **61**, 289-294.
- Buchen, C. & Osmond, C.** (1987) Potato Y potyvirus. Descriptions of Plant Viruses 242.
- Collar, J. L. & Fereres, A.** (1998) Nonpersistent Virus Transmission Efficiency Determined by Aphid Probing Behavior During Intracellular Punctures. *Environ. Entomol.* **27**(3), 583-591.
- DiFonzo C. D.** (1995) Epidemiology and control of potato virus Y (PVY) in the Red River Valley of Minnesota and North Dakota.
- Dixon, A. F. G.** (1998) *Aphid Ecology*. Second Edition. Blackie, Glasgow.
- Eastop, V.F.** (1973) Deductions from the present day host plants of aphids and related insects. In H. F. van Emden (eds), *Insect-Plant Relationships*. Academic Press. London. pp. 157-178.

- Fereres, A., Perez, P., Gemeno, C. & Ponz, F.** (1993) Transmission of Spanish Pepper and Potato PVY Isolates by Aphid (Homoptera: Aphididae) Vectors: Epidemiological Implications. *Environ. Entomol.* **22**(6), 60-1265.
- Fereres, A. & Collar, J. L.** (2001), Analysis of Noncirculative Transmission by Electrical Penetration Graphs. *In* K. F. Harris, O. P. Smith & J. E. Duffus (eds.), *Virus Insect Plant Interaction*. Academic Press. New York. pp. 87-103.
- Γεωργόπουλος, Σ. Γ.** (1984) Βασικές Γνώσεις Φυτοπαθολογίας. **8**, 199-213.
- Harris, K. F.** (1977) An ingestion-egestion hypothesis of non-circulative virus transmission. *In* K. F. Harris & K. Maramorosch (eds.), *Aphids as Virus Vectors*. Academic Press. New York. pp. 165-220.
- Harris, K. F. & Harris, L. J.** (2001) Ingestion – Egestion Theory of Cuticula – Borne Virus Transmission. *In* K. F. Harris, O. P. Smith & J. E. Duffus (eds.), *Virus Insect Plant Interaction*. Academic Press. New York. pp. 111-129.
- Heie, O. E.** (1980) *The Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. II. The Family Drepanosiphidae*. Scandinavian Science Press, Klampenborg. pp.176.
- Katis, N., Tsitsipis, I. A., Avgelis, A., Gargalianou, J., Papapanayotou, A. & S. Milla.** (1998) Aphid populations and potato virus Y potyvirus (PVY) spread in potato fields. pp. 585-593.
- Κατής, Ν. Ι.** (2000) *Ιολογία φυτών*. Εκδόσεις Πήγασος. Θεσσαλονίκη. pp.378.
- Κατής, Ν. Ι.** (2004) *Σημειώσεις Ιολογίας*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. pp. 82.
- Kennedy, J. E., Day S. T. & Eastop, V. F.** (1962) *A conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses*, Commonwealth Institute of Entomology, London. pp. 114.
- Κυριακοπούλου, Π. Η.** (1996) *Συμπληρωματικές σημειώσεις Γενικής Φυτοπαθολογίας*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. κεφάλαιο: Εισαγωγή εις την ιολογία φυτών, pp. 112.
- Margaritopoulos, J. T., Tsitsipis, J. A., Goundoudaki, S. & Blackman, R. L.** (2002) Life cycle variation of *Myzus Persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) in Greece. *Bull. Entomol. Res.* **92**, 309-320.

- Margaritopoulos, J. T., Tsourapas, C., Tzortzi, M., Kanavaki O. M. & Tsitsipis J. A.** (2005) Host selectio by winged colonizers within the *Myzus persicae* groyp: a contribution towards understanding host specialization. *Ecolog. Entomol.* **30**, 1-13.
- Martin, B., Collar, J. L., Tjallingii, W. F. & Fereres, A.** (1997) Intracellular salivation and ingestion by aphids causes the inoculation and acquisition of non-persistently transmitted plant viruses. *J. Gen Virol.* **78**, 2701-2705.
- Matthews, R. E. F.** (1991) Control measures and vector avoidance. *In* Plant Virology, 3rd edition. Academic. New York. pp. 611-618.
- Papadopoulou, A., Chrysochoou, A. P., Katis, n., Sannino, L., Tarantino, P. & Lahoz, E.** (2004) Evaluation of new insecticides, aphid alarm pheromone, biopesticides, application techniques. *Il Tabacco* **12**, 74-81.
- Perez, P., Collar, J. L., Avilla, C., Dugue, M. & Fereres, A.** (1995) Estimation of Vector Propensity of Potato Virus Y in Open – Field Pepper Crops Of Central Spain. *Ecolog. Entomol.* **88**, 986-991.
- Powell, G.** (1991) The effect of mineral oil on stylet activities and potato virus by aphids, *Entomol. Exp. Appl.* **63**, 237-242.
- Powell, G., Harrington, R. & Spiller, N. J.** (1992) Stylet activities and potato virus Y vector efficiencies by the aphids *Brachycaudus helichrysi* and *Drepanosiphum platanoidis*. *Entomol. Exp. Appl.* **62**, 293-300.
- Shaposhnikov, G. Ch.** (1985) The main features of the evolution of aphids. *In* “*Evolution and Biosystematics Of Aphids*”, Proceedings of the International Aphidological Symposium at Jablonna, 1981, Polsska Akademia Nauk, Ossilinium, Warsawa, pp. 19-99.
- Τζανακάκης, Μ. Ε. και Κατσόγιαννος, Β. Ι.** (2003) Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Εκδόσεις ΑγροΤύπος. Αθήνα. pp. 360.
- Van Emden, H. F., Eastop. V. F., Hughes, R. D. & Way, M. J.** (1969) The ecology of *Myzus persicae*. *Ann. Rev. Entomol* **14**, 197-270.
- Walsh, K., North j., Barker I. & Boonham, N.** (2000) Detection of different strains of *Potato virus Y* and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR. *J. Virol. Met.* **91**, 167-173.

**Wang, R. Y., Ammar, E. D., Thornbury, D. W., Lopez-Moya, J. J., & Pirone, T. P. (1996).** Loss of potyvirus transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. *J. Gen. Virol.* **77**, 861-867.

Institut National De La Recherche Agronomique. <http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/3myzper.htm-9k>

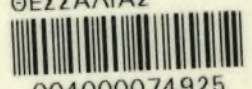
Ημερομηνία πρόσβασης 12/08/05.

<http://plantpath.ifas.ufl.edu/Inclusionpage/potato/PVYpotato.html>. Ημερομηνία πρόσβασης 28/08/05.

Ε. Π. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΑΚΗΣ  
Ε. Π. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΑΚΗΣ  
Ε. Π. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΑΚΗΣ  
Ε. Π. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΑΚΗΣ  
Ε. Π. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΑΚΗΣ  
Ε. Π. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΑΚΗΣ  
Ε. Π. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΑΚΗΣ  
Ε. Π. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΑΚΗΣ  
Ε. Π. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΑΚΗΣ  
Ε. Π. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΑΚΗΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000074925