

ΤΕΙ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ
(ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**“ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
HARPIN, ACIBENZOLAR-S-METHYL ΚΑΙ
LAMINARIN ΣΤΗΝ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΕΝΤΑΣΗΣ
ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΦΥΤΩΝ ΚΟΛΟΚΥΘΙΑΣ ΑΠΟ
ΤΟ ΜΩΣΑΪΚΟ ΤΗΣ ΚΑΡΠΟΥΖΙΑΣ (WMV)”**

ΤΟΥ: ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΟΥ Β. ΖΑΜΠΑΡΑ

ΕΠΙΒΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΠΑΠΑΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΟΙ ΙΟΙ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	2
1.1.1 Πώς μεταδίδονται οι ιοί	3
1.1.2 Πώς πολλαπλασιάζονται οι ιοί.....	4
1.1.3 Πώς εκδηλώνονται οι ιολογικές ασθένειες	5
1.1.4 Πώς γίνεται η διάγνωση της ιολογικής ασθένειας	6
1.2 Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΜΩΣΑΪΚΟΥ ΤΗΣ ΚΑΡΠΟΥΖΙΑΣ.....	7
1.2.1 Ο Ιός της δακτυλιωτής κηλίδωσης της παπάγιας.....	10
1.3 ΑΦΙΔΕΣ	12
1.3.1 <i>Aphis craccivora</i> Koch	13
1.4 ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΦΙΔΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΩΝ ΜΗ ΕΜΜΟΝΩΝ ΙΩΝ	16
1.5 ΤΟ ΑΜΥΝΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	19
1.5.1 Το παθητικό αμυντικό σύστημα	20
1.5.2 Το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα	21
1.5.2.1 Το βασικό ανοσοποιητικό σύστημα.....	22
1.5.2.2 Το ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας.....	22
1.5.2.3 Η θεωρία του 'γονίδιο-προς-γονίδιο' και η υπόθεση του φρουρού	25
1.5.2.4 Αντίδραση υπερευαισθησίας	26
1.6 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΤΟΧΗ (SAR).....	28
1.6.1 Το Σήμα	29
1.6.2 Πρωτεΐνες Παθογένεσης (Pathogenesis- related proteins, PR – Proteins).....	31
1.6.3 Μηχανισμοί της SAR των φυτών εναντίον ιολογικών ασθενειών.....	33
1.6.3.1 Αντίδραση Υπερευαισθησίας – Ιοί	35
1.6.3.2 Ο ρόλος του Σαλικυλικού Οξέος (<i>Salicylic Acid, SA</i>) στην αντιμετώπιση των ιών.....	35
1.6.3.3 Γονιδιακή αποσιώπηση (<i>RNA silencing</i>).....	37
1.6.3.4 Άλλοι μηχανισμοί άμυνας	38
1.6.3.5 Ο ρόλος των αφίδων στην επαγωγή της ανοσοποίησης	39
1.6.4 Παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη διέγερση της ανοσοποίησης	39
1.6.4.1 Συνθετικές ενώσεις.....	40
1.6.4.1.1 <i>Acibenzolar-S-methyl</i>	41
1.6.4.1.2 <i>Laminarin</i>	42
1.6.4.1.3 <i>Harpin</i>	44
2. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
2.1 ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΑΦΙΔΩΝ.....	45
2.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ	46
2.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ.....	48
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμότερα τον καθηγητή μου Δρ Αριστείδη Παπαπαναγιώτου για την επίβλεψη και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας την οποία αφιερώνω με πολλή αγάπη στην οικογένεια μου.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ζημιογόνος επίδραση μιας ιολογικής προσβολής σε μια καλλιέργεια μπορεί να κυμαίνεται από μερικά διάσπαρτα μολυσμένα φυτά στον αγρό, έως και συνολικά στη σοδειά με επακόλουθο την πλήρη καταστροφή της (90-100%) (Balogun κ.ά., 2009), αναλόγως των επικρατούντων συνθηκών. Η μολυσματικότητα των ικών στελεχών, η ταυτόχρονη μόλυνση των φυτών από άλλα παθογόνα και η ευπάθεια της καλλιεργούμενης ποικιλίας επιδρούν στην έκταση και ένταση της μόλυνσης. Επίσης, το χρονικό σημείο κατά το οποίο εκδηλώνεται η ασθένεια, η ηλικία του φυτού, ο πληθυσμός των εντόμων-φορέων αλλά και οι περιβαλλοντικές συνθήκες αποτελούν παράγοντες που διαφοροποιούν τον βαθμό της μόλυνσης κατά περίπτωση (Balogun κ.ά., 2009; Taiwo και Akinjogunla, 2006). Δεν έχει βρεθεί θεραπεία για τους φυτικούς ιούς και δεν υφίσταται, κατά συνέπεια, επιτυχής μέθοδος αντιμετώπισής τους σε εμπορική κλίμακα.

Ο ιός του μωσαϊκού της καρπουζιάς (Watermelon mosaic virus, WMV) προσβάλλει εκτεταμένα υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειες κολοκυνθοειδών στη χώρα μας, με σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις στις αποδόσεις των καλλιεργειών (Παπαβασιλείου κ.ά., 2002). Οι μέθοδοι αντιμετώπισης της ίωσης περιορίζονται κυρίως σε προληπτικά μέτρα που αφορούν στην μεταφύτευση υγιούς φυτικού υλικού αλλά και σε συνδυασμό μεθόδων που διαμορφώνουν μια ολοκληρωμένη προσέγγιση διαχείρισης. Στα μέτρα αυτά συγκαταλέγονται η μετατόπιση της εποχής σποράς σε περιόδους που οι αριθμοί των φορέων δεν είναι ιδιαίτερα υψηλοί, η ανάπτυξη άνοσων φυτών-φρακτών γύρω από τις καλλιέργειες, η εφαρμογή ορυκτελαίων ανά τακτά χρονικά διαστήματα, η τοποθέτηση αντανακλαστικών επιφανειών (αλουμινόχαρτο) για την 'απόθηση'/αποπροσανατολισμό των πτερωτών αφίδων που κατευθύνονται προς τις καλλιέργειες κ.ά. Η πραγματοποίηση επεμβάσεων με εντομοκτόνα-αφιδοκτόνα εναντίον των εντόμων-φορέων εγκαίρως, παρότι συστήνεται, δεν προκαλεί αξιόλογη ανάσχεση της ραγδαίας εξάπλωσης του ικού μολύσματος, τουλάχιστον στην περίπτωση των μη-έμμονων ιών. Η επίκτητη διασυστηματική ανοχή (SAR) έχει διερευνηθεί εκτεταμένα ως μέτρο αντιμετώπισης των ιών αλλά και μεγάλου εύρους άλλων παθογόνων, δεδομένου ότι υπάρχουν ενθαρρυντικά στοιχεία επιτυχούς αντιμετώπισης πολλών ασθενειών. Η ενεργοποίηση της SAR είναι δυνατή και με την εφαρμογή χημικών σκευασμάτων. Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφορά στην πειραματική αξιολόγηση τριών δραστικών ουσιών,

των harpin, laminarin και ASM (acibenzolar-S-methyl) οι οποίες εφαρμόστηκαν σε φυτά κολοκυθιάς τα οποία μετά την εφαρμογή τους μολύνθηκαν τεχνητά με τον ιό WMV. Η μελέτη αποσκοπούσε στην καταγραφή διαπιστώσεων σχετικά με την ενεργοποίηση ή όχι της SAR κατόπιν εφαρμογής των προαναφερθέντων χημικών ουσιών και την πιθανή διαφοροποίηση τόσο της έντασης όσο και της συχνότητας εμφάνισης της ασθένειας.

1.1 ΟΙ ΙΟΙ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 1000 ιοί από τους οποίους οι 600 είναι φυτοπαθογόνοι. Οι ιοί ορίζονται ως *«υπερμικροσκοπικές μολυσματικές οντότητες νουκλεοπρωτεΐνης φύσεως που αναπαράγονται μόνο σε ζωντανά κύτταρα οργανισμών, στους οποίους μπορεί να προκαλέσουν ασθένεια.»* Είναι, δηλαδή, σωματίδια αποτελούμενα από ένα νουκλεοξύ (RNA ή DNA) και πρωτεΐνη και συμπεριφέρονται ως υποχρεωτικά παράσιτα (Ηλιόπουλος, 2004).

Οι ιοί αποτελούνται από σωματίδια. Το ιικό σωματίδιο ονομάζεται *βίριον* (virion) και αποτελείται από ένα νουκλεοξύ και ένα πρωτεϊνικό περίβλημα. Το νουκλεοξύ είναι συνήθεστερα απλής αλυσίδας RNA (ssRNA) και σπανιότερα διπλής αλυσίδας RNA (dsRNA), ενώ σε λίγους φυτοπαθογόνους ιούς είναι DNA (ssDNA ή dsDNA). Το περίβλημα που λειτουργεί προστατευτικά για το νουκλεοξύ, ονομάζεται καψίδιο (capsid) και αποτελείται από πολυπεπτιδικές αλυσίδες στις οποίες έχει δοθεί η ονομασία *υπομονάδες πρωτεΐνης ή καψομερή* (capsomeres). Η πρωτεΐνη των ιών είναι μεγάλου μοριακού βάρους, αποτελούμενη από μεγάλο αριθμό αμινοξέων. Οι περισσότεροι ιοί έχουν το γονιδίωμά τους σε ένα σωματίδιο όποτε ονομάζονται μονοσωματιδιακοί, ενώ όσοι το έχουν κατανεμημένο σε δύο, τρία ή και τέσσερα σπανιότερα, ονομάζονται πολυσωματιδιακοί. Σε μερικές περιπτώσεις ιών, το σωματίδιο περιβάλλεται από μεμβράνη λιποπρωτεϊνικής φύσεως (φάκελος) (Ηλιόπουλος, 2004).

Ανάλογα με το σχήμα που έχουν τα σωματίδιά τους, οι ιοί μπορεί να είναι ανισομετρικοί στους οποίους τα σωματίδια είναι επιμήκη, και ισομετρικοί στους οποίους τα σωματίδια είναι πολυεδρικά (συνήθως εικοσαεδρικά) (Ηλιόπουλος, 2004). Οι μισοί σχεδόν ιοί είναι νηματόμορφοι, πολλοί είναι πολυεδρικοί, ενώ ορισμένοι είναι ραβδόμορφοι (Τζάμος, 2007).

1.1.1 Πώς μεταδίδονται οι ιοί

Η μετάδοση των ιών γίνεται με παθητικό τρόπο. Το κυτταρικό τοίχωμα του φυτικού κυττάρου μπορεί να διαπεραστεί μόνο με τη βοήθεια φορέων ή μέσω πληγών που προκαλούνται μηχανικά. Επιβάλλεται συνεπώς να λυθεί πρώτα η συνέχεια των προστατευτικών στρωμάτων του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης προκειμένου να επιτευχθεί η είσοδος του ιού (Τζάμος, 2007). Πιο συγκεκριμένα, όταν προκαλούνται πληγές στα φυτά κατά τη διάρκεια των καλλιεργητικών εργασιών, μολυσμένος φυτικός χυμός δύναται να μεταφερθεί σε υγιές φυτό που υπέστη λύση της συνέχειας των ιστών και να μεταδοθεί έτσι ο ιός στον ξενιστή. Ο κυριότερος όμως τρόπος μετάδοσης των ιών είναι μέσω μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού, πχ. μοσχεύματα, εμβόλια, ριζώματα κ.ά. (Ηλιόπουλος, 2004). Ορισμένοι ιοί μεταδίδονται μέσω του σπόρου είτε γιατί βρίσκονται στα καλύμματα των σπερμάτων είτε γιατί βρίσκονται στους ιστούς του εμβρύου. Οι σπορομεταδιδόμενοι ιοί μεταδίδονται και μέσω μολυσμένης γύρης. Οι ιοί, τέλος, λόγω του υπερμικροσκοπικού τους μεγέθους, συχνότατα προσλαμβάνονται και μεταδίδονται κατά τη διατροφική δραστηριότητα εντόμων (πρωτίστως), ακάρεων, νηματωδών, αλλά και μέσω μυκήτων και του σπερματοφύτου παράσιτου κουσκούτα (Τζάμος, 2007).

Υφίστανται διαφορετικές σχέσεις ιού-φορέα. Ορισμένοι ιοί μεταδίδονται από ένα μόνο γένος εντόμων (π.χ. ο ιός του κίτρινου μωσαϊκού της πατάτας μεταδίδεται μόνο με έντομο του γένους *Agalia*), ενώ κάποιοι ιοί μεταδίδονται με περισσότερα είδη εντόμων [επί παραδείγματι, ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (*Cucumber mosaic virus*, CMV) μεταδίδεται με περισσότερα από 100 είδη αφίδων-φορέων]. Αντίστροφα, κάποια είδη εντόμων μεταδίδουν περισσότερους του ενός ιούς και σε διαφορετικές κατηγορίες ξενιστών, ενώ κάποια έντομα είναι εξειδικευμένοι φορείς ενός μόνο είδους ιού (Ηλιόπουλος, 2004).

Ανάλογα με τον χρόνο παραμονής των ιών σε μολυσματική κατάσταση στο έντομο-φορέα, οι ιοί διακρίνονται σε έμμοιους, σε μη-έμμοιους και ημιέμμοιους. Πιο αναλυτικά, έμμοιοι είναι οι ιοί που παραμένουν εντός του φορέα για μεγάλο χρονικό διάστημα, συχνά καθόλη τη διάρκεια ζωής του εντόμου-φορέα. «Ο χρόνος μεταξύ τροφικής δραστηριότητας πρόσληψης του ιού από το έντομο-φορέα και μετάδοσης του ιού είναι μακρός» (Ηλιόπουλος, 2004). Μη έμμοιοι είναι οι ιοί που δεν παραμένουν σε μολυσματική κατάσταση στα στοματικά μόρια του φορέα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, το έντομο-φορέας διατηρεί τη

μολυσματική του ικανότητα για διάστημα λίγων μόνο ωρών μετά την πρόσληψη του ιού από το μολυσμένο φυτό-πηγή. Απαιτούνται μόλις λίγα δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά πραγματοποίησης δοκιμαστικών νυγμάτων του εντόμου στο μολυσμένο φυτό ώστε να μπορεί να μεταδώσει τον ιό σε υγιές φυτό μέσω του στιλέτου των στοματικών του μορίων (Τζάμος, 2007; Ηλιόπουλος, 2004). Δηλαδή, ο χρόνος βόσκησης' του φορέα, πρόσληψης και μετάδοσης του ιού είναι σύντομος (δεν υπάρχει λανθάνουσα περίοδος στον φορέα) (Ηλιόπουλος, 2004).

Τέλος, ημιέμμονοι είναι εκείνοι οι ιοί που παραμένουν και μπορούν να μεταδοθούν από τον φορέα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τους μη έμμορους (Ηλιόπουλος, 2004). Ο ιός παραμένει στον οισοφάγο της αφίδας και μεταφέρεται στο υγιές φυτό όταν το έντομο απομυζεί τους φυτικούς χυμούς. Ο ιός αδυνατεί να μεταφερθεί κατά την έκδυση του εντόμου ή την ωτοκία του (Τζάμος, 2007).

1.1.2 Πώς πολλαπλασιάζονται οι ιοί

Οι ιοί συγκαταλέγονται στα υποχρεωτικά παράσιτα. Ο ιός-παράσιτο εισέρχεται στον ξενιστή και ενσωματώνεται (αξιοποιεί) τον μεταβολισμό των ξένων κυττάρων τα οποία εν συνεχεία τον αναπαράγουν. Πιο συγκεκριμένα, με την είσοδο του ιού, αποβάλλεται το πρωτεϊνικό περίβλημα και ο ιός 'κατευθύνει' το κύτταρο του ξενιστή ώστε να παράξει το ένζυμο ρεπλικάση-RNA μέσω του οποίου γίνεται ο αναδιπλασιασμός της αλυσίδας του νουκλεοξέος του ιού. Επίσης, το κύτταρο του ξενιστή χρησιμοποιείται για να συντεθεί η πρωτεΐνη του ιού ο οποίος χρησιμοποιεί τα αμινοξέα του πρωτοπλάσματος και τα ριβοσώματα. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, από τα νέο-παραχθέντα νουκλεοξέα και τις πρωτεΐνες προκύπτουν νέα σωματίδια. Η διαδικασία εκτυλίσσεται με πολύ ταχείς ρυθμούς για την παραγωγή πολύ μεγάλου αριθμού σωματιδίων στο κύτταρο. Η υπερσυσσώρευση των σωματιδίων προκαλεί διάλυση του κυττάρου, απελευθέρωση των σωματιδίων του ιού και μεταφορά τους σε παρακείμενα υγιή κύτταρα μέσω των πλασμοδεσμάτων. Επομένως, οι ιοί είναι διασυστηματικά παθογόνα, πολλαπλασιάζονται και μετακινούνται διασυστηματικά σε όλο το φυτό μέσω του ρεύματος μεταφοράς θρεπτικών στοιχείων. Οι πρωτεΐνες κίνησης που βρίσκονται κωδικοποιημένες στον ιό ρυθμίζουν την κίνησή του μέσα στο φυτό. Η ταχύτητα της διασυστηματικής μετακίνησης των ισοσωματίων μέσω των κυττάρων του ηθμού υπολογίζεται στα 2cm/λεπτό (Τζάμος, 2007; Ηλιόπουλος, 2004).

Το νουκλεοξύ είναι το στοιχείο του ιού που φέρει τη μολυσματική δυνατότητα εν αντιθέσει με το περίβλημα που δρα απλώς προστατευτικά. Όταν το νουκλεοξύ καταστρέφεται, αδρανοποιείται και ο ιός. Ενώ οι μύκητες και τα βακτήρια δρουν επιζήμια καταστρέφοντας τη δομή του κυττάρου του ξενιστή, οι ιοί προκαλούν ζημιά αποδιοργανώνοντας τις μεταβολικές λειτουργίες του κυττάρου και εμποδίζοντας τη διεξαγωγή βασικών λειτουργιών όπως η φωτοσύνθεση και η αναπαραγωγή (Ηλιόπουλος, 2004).

1.1.3 Πώς εκδηλώνονται οι ιολογικές ασθένειες

Όταν ένα φυτό προσβληθεί από ιό, αναλόγως το είδος του ιού και την ένταση της ασθένειας, καθώς και τον ξενιστή και τις κλιματικές συνθήκες, εκδηλώνει διάφορα συμπτώματα που ποικίλουν από την καθυστερημένη ανάπτυξη έως και τον νανισμό (έντονη καθήλωση της ανάπτυξής του). Στα φύλλα προκαλούνται μωσαϊκό, ίκτερος, κηλιδώσεις, καρουλιάσματα, δεσμίωση, στένωση έως νημάτωση του ελάσματος. Στα άνθη παρατηρούνται ποικιλόχρωση, διάσπαση του χρώματος και φυλλωδία (μετατροπή των μερών του άνθους σε φυλλίδιο). Οι καρποί μπορεί να εμφανίσουν διακτυλιοειδείς κηλίδες, μωσαϊκό και μικροκαρπία ή παραμορφώσεις. Στους βλαστούς μπορεί να προκληθούν παραμορφώσεις (βραχυγονάτωση, πλάτυνση και δεσμίωση, σκούπα της μάγισσας), έλκη, βοθρίωση στο ξύλο, απολέπιση του κορμού κ.ά. Στις ρίζες των προσβεβλημένων φυτών εκδηλώνονται ριζομανία, νεκρώσεις και όγκοι (Ηλιόπουλος, 2004). Υπάρχουν βέβαια και περιπτώσεις όπου η προσβολή του ιού είναι λανθάνουσα, δεν εκδηλώνονται δηλαδή συμπτώματα στο μολυσμένο φυτό (Τζάμος, 2007).

Σε ανατομικό επίπεδο και επίπεδο φυσιολογίας, τα προσβεβλημένα φυτά παρουσιάζουν ανωμαλίες όπως διάλυση των χυμοτοπίων, μείωση στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης, συσσώρευση αμύλου, αυξημένη λειτουργία πολλών ενζύμων, αυξημένο ρυθμό αναπνοής, ορμονικές διαταραχές κ.ά. Να σημειωθεί ότι τα ιολογικής φύσεως συμπτώματα είναι παρόμοια με εκείνα που προκαλούνται στο φυτό λόγω άλλων παραγόντων, όπως γενετικές ανωμαλίες, θερμοκρασιακές καταπονήσεις, φυτοτοξικότητα από ακατάλληλη εφαρμογή ζιζανιοκτόνων, τροφοπενίες κ.ά. (Τζάμος, 2007).

1.1.4 Πώς γίνεται η διάγνωση της ιολογικής ασθένειας

Η διάγνωση των ιολογικών ασθενειών γίνεται είτε βάσει συμπτωματολογίας είτε βάσει εργαστηριακής εξέτασης. Σε περίπτωση που δεν είναι εύκολος ο διαχωρισμός μεταξύ ιολογικής ασθένειας και μη παρασιτικών αιτιών, ο μόνος τρόπος αξιόπιστης ταυτοποίησης είναι μέσω μίας εκ των ακόλουθων εργαστηριακών μεθόδων:

- Μόλυνση φυτών-δεικτών: μερικά φυτά εμφανίζουν χαρακτηριστικά συμπτώματα μετά από τη μόλυνσή τους με συγκεκριμένους ιούς, οπότε τα φυτά αυτά μολύνονται με τον χυμό του ασθενούς φυτού για να πιστοποιηθεί η φύση του φυτοπαθογόνου.
- Εμβολιασμός: εμβολιάζοντας υγιές φυτό με ασθενές εμβόλιο, μπορούμε να διαπιστώσουμε εάν το αρχικό ασθενές φυτό πάσχει όντως από ιό ή από άλλα, μη παθολογικά αίτια (τροφοπενία).
- Ανοσολογικές τεχνικές-Οροδιαγνωστικές μέθοδοι

Στην περίπτωση των ιών, ο ερευνητής καταφεύγει πολύ συχνά σε ανοσολογικές τεχνικές με τις οποίες το παθογόνο ταυτοποιείται λαμβάνοντας δείγμα από τους ιστούς του φυτού, ενώ η διαδικασία ολοκληρώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Η λογική των ανοσολογικών μεθόδων έχει ως εξής: όταν οι ζωικοί οργανισμοί προσβάλλονται από κάποιο παθογόνο, είναι σε θέση να αναγνωρίσουν την παρουσία πρωτεϊνών ξένων προς τον οργανισμό τους. Αυτές οι ουσίες, ή αλλιώς αντιγόνα, 'ειδοποιούν' τον αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού ο οποίος με τη σειρά του δημιουργεί αντισώματα. Τα αντισώματα παραλαμβάνονται από τον ξενιστή-οργανισμό με τη μορφή αντιορού. Κάθε αντιορός είναι εξειδικευμένος για διάφορους μικροοργανισμούς. Όταν το αντίσωμα ενώνεται με την πρωτεΐνη του μικροοργανισμού, το αντίστοιχο αντιγόνο δηλαδή, την αδρανοποιεί σχηματίζοντας συσσωματώματα. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ανοσολογικές τεχνικές είναι η δοκιμή κατακρήμνισης σε αντικειμενοφόρο πλάκα ή δοκιμαστικό σωλήνα, ο ανοσοφθορισμός, η ανοσοδιάχυση ή διπλή διάχυση σε άγαρ, η αντίδραση συγκόλλησης και η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Η ELISA είναι σχετικά απλή και γρήγορη μέθοδος η οποία μπορεί να εφαρμοσθεί ακόμα και επιτόπια στον αγρό, με φορητό εξοπλισμό. Χρησιμοποιείται περισσότερο για αναγνώριση ιών και σπανιότερα βακτηρίων και μυκήτων.

Οι δοκιμές γίνονται σε μια ειδική πλάκα που φέρει πολλά βοθρία εμποτισμένα με αντιορούς συγκεκριμένων μυκήτων. Στα βοθρία εν συνεχεία τοποθετούνται δείγματα από χυμούς προσβεβλημένων φυτών και εφόσον υπάρχει στον χυμό ιός με αντιγόνο που αντιστοιχεί σε αντίσωμα του αντιορού, τότε δημιουργείται αντίδραση που εκδηλώνεται με αλλαγή στο χρώμα και μετρίεται με ειδικό χρωματόμετρο (Ηλιόπουλος, 2004).

1.2 Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΜΩΣΑΪΚΟΥ ΤΗΣ ΚΑΡΠΟΥΖΙΑΣ

Η ασθένεια οφείλεται στον ιό Watermelon Mosaic Virus (WMV) που ανήκει στο γένος Potyvirus της οικογένειας Potyviridae. Ο ιός έχει νηματοειδή σωματίδια μήκους 780 nm με μονονηματικό RNA. Εκδήλωση του ιού έχει αναφερθεί σε πολλές χώρες, μεταξύ των οποίων είναι η Αυστραλία, η Τσεχοσλοβακία, η Χιλή, η Ουγγαρία, το Ισραήλ, η Ιταλία, η Αμερική κ.α., ενώ στην Ελλάδα αναφορά για πρώτη φορά έγινε στην Κρήτη το 1983. Στη χώρα μας ο ιός προσβάλλει εκτεταμένα υπαίθριες αλλά και θερμοκηπιακές καλλιέργειες κολοκυνθοειδών με σοβαρές επιπτώσεις για τις καλλιέργειες. Σε πρόσφατες σχετικά επιδημιολογικές μελέτες διαπιστώθηκε η κυρίαρχη παρουσία του συγκριτικά με όλους τους εντομομεταδιδόμενους ιούς που προσβάλλουν τα κολοκυνθοειδή της χώρας (Παπαβασιλείου κ.ά., 2002). Πέραν των φυτών της οικογένειας Cucurbitaceae τα οποία αποτελούν τους κύριους ξενιστές, προσβολές έχουν παρατηρηθεί και σε καλλιεργούμενα και αυτοφυή φυτά της οικογένειας Leguminosae αλλά και των οικογενειών Chenopodiaceae, Euphorbiaceae, Solanaceae κ.ά. Ο ιός δεν μεταδίδεται με τον σπόρο της αγγουριάς, του αρακά, της κολοκυθιάς και της καρπουζιάς. Πηγές του ιού αποτελούν οι καλλιεργούμενοι ξενιστές του καθώς και διάφορα αυτοφυή είδη όπως η πικραγγουριά (*Ecballium elaterium*), το τραχύ βλήτο (*Amaranthus retroflexus*), η στελλάρια (*Stellaria media*), η αγριοβαμβακιά (*Abutilon theophrasti*), το αγριοσέλινο (*Ammi majus*), η μικρή τσουκνίδα (*Urtica urens*), η μολόχα (*Malva parviflora*) κ.ά. (Παπαπαναγιώτου, 2005). Μεταδίδεται με αφίδες με μη έμμονο τρόπο. Έχουν αναγνωρισθεί ως φορείς του ιού περί τα 39 είδη αφίδων που ανήκουν σε 19 είδη (Παπαπαναγιώτου και Μαράντης, 2011; Perring κ.ά., 1992).

Τα συμπτώματα προσβολής των μολυσμένων φυτών περιλαμβάνουν:

- Στα φύλλα: περινεύριο μεταχρωματισμό (vein banding), μωσαϊκό και παραμόρφωση.

- Στους καρπούς: μωσαϊκό, βοθριώσεις, παραμορφώσεις.

Πιο συγκεκριμένα, στην κολοκυθιά και πεπονια παρατηρούνται:

- Έντονη παραμόρφωση των φύλλων τα οποία μπορεί να παρουσιάσουν και νημάτωση.
- Γλωσσίδια.
- Μωσαϊκό με την εμφάνιση μεγάλων (10 mm) ή και μικρών (2-4 mm) νησίδων σκούρου πράσινου χρώματος. Στα σημεία των νησίδων, το έλασμα αναπτύσσεται ταχύτερα δίνοντας την εντύπωση δημιουργίας φλυκταινών.
- Στην κολοκυθιά, η παραγωγή είναι μειωμένη, οι καρποί είναι μικρότεροι του κανονικού μεγέθους και παρουσιάζουν ακανόνιστες βαθύνσεις. Στην πεπονια, οι καρποί επίσης είναι μικρότεροι του αναμενόμενου μεγέθους και φέρουν νησίδες, είτε λίγες μεγάλες (10 cm) είτε πολλές μικρές σκούρου πράσινου χρωματισμού (Παναγόπουλος, 2000). Στην καρπουζιά, ο ιός προκαλεί περινεύριο μεταχρωματισμό ο οποίος έχει τη μορφή στενής βαθυπράσινης λωρίδας στο έλασμα από τις δύο πλευρές των νεύρων, καθώς και ήπια παραμόρφωση των νεύρων.

Σε γενικές γραμμές, η συμπτωματολογία εξαρτάται πολύ από τη φυλή του ιού καθώς και το γονότυπο του ξενιστή (Παπαπαναγιώτου, 2005; Παναγόπουλος, 2000).



Εικόνα 1. Στένωση ελάσματος και φλυκταινοειδές μωσαϊκό σε φύλλα φυτού κολοκυθιάς προσβεβλημένο από τον ιό WMV (www.stclareseeds.com).



Εικόνα 2. Έντονη παραμόρφωση, δεσμίωση και στένωση του ελάσματος (utahpests.usu.edu.)



Εικόνα 3. Τυπικά συμπτώματα προσβολής κολοκυθιάς από τον ιό WMV. Παραμορφώσεις (βοθρία, βυθύνσεις) καρπών και φύλλου κολοκυθιάς (pnwhandbooks.org)

Παραπλήσια συμπτώματα εκτός των άλλων αφιδομεταδιδόμενων, μη-έμμονων ιών που προσβάλλουν τα κολοκυνθοειδή προκαλεί και ο ιός της δακτυλιωτής κηλίδωσης της παπάγιας (Paraya ringspot virus, PRSV) (προηγούμενη ονομασία ιός του μωσαϊκού της καρπουζιάς 1, Watermelon mosaic virus, WMV 1), γι' αυτό θα γίνει μια σύντομη αναφορά των συμπτωμάτων, των ξενιστών και της επιδημιολογίας του συγγενούς αυτού ιού.

1.2.1 Ο Ιός της δακτυλιωτής κηλίδωσης της παπάγιας

Η ασθένεια παλαιότερα αποδίδονταν στον ιό 1 του μωσαϊκού της καρπουζιάς (Watermelon Mosaic Virus 1, WMV 1) που αποτελούσε φυλή του ιού της δακτυλιωτής κηλιδώσεως της παπάγιας (Paraya ringspot virus, PRSV) (Παναγόπουλος, 2000). Έχουν ταυτοποιηθεί δύο τύποι του PRSV, αναλόγως τον ξενιστή. Ο τύπος P (paraya) (PRSV-P) προσβάλλει την παπάγια, ενώ ο τύπος W (watermelon) (PRSV-W) προσβάλλει την καρπουζιά και άλλα κολοκυνθοειδή (Παπαπαναγιώτου, 2005). Πλέον, ως παθογόνο αίτιο θεωρείται ο ιός της δακτυλιωτής κηλίδωσης της παπάγιας. Ο ιός ανήκει στο γένος Potyvirus της

οικογένειας Potyviridae. Στη χώρα μας προσβάλλει την καρπουζιά, την κολοκυθιά, την αγγουριά και την πεπονιά. Εμφανίζει όμως μικρότερη συχνότητα προσβολής σε σύγκριση με τους άλλους αφιδομεταδιδόμενους μη έμμοнос ιούς των κολοκυνθοειδών (Παπαβασιλείου κ.ά., 2002).

Ο ιός μεταδίδεται μέσω αφίδων με μη έμμονο τρόπο. Τουλάχιστον 24 είδη αφίδων έχουν αναγνωριστεί ως φορείς του ιού τα οποία ανήκουν σε 15 γένη. Ο ιός δε μεταδίδεται με το σπόρο των καλλιεργούμενων κολοκυνθοειδών. Πηγές του ιού αποτελούν τα καλλιεργούμενα κολοκυνθοειδή, ενώ σε θερμές περιοχές ξενιστές αποτελούν και τα αυτοφυή είδη της βοτανικής αυτής οικογένειας, όπως τα *Melothria pendula* και *Momordica* spp. (Chin κ.ά., 2007).

Τα συμπτώματα που παρουσιάζουν ιδιαίτερος τα ευπαθή φυτά-ξενιστές (πέρα από την καθυστερημένη ανάπτυξη και τον νανισμό), εκδηλώνονται έντονα στα φύλλα και τους καρπούς και συμπεριλαμβάνουν:

- Πράσινο μωσαϊκό.
- Φλυκταινοειδές μωσαϊκό.
- Στένωση του ελάσματος των φύλλων (στα κορυφαία φύλλα μάλιστα η στένωση είναι αρκετά εντονότερη, σε σημείο που το έλασμα περιορίζεται στο κεντρικό νεύρο, εμφανίζει δηλαδή νημάτωση).
- Παραμορφώσεις των φύλλων.
- Παραμορφώσεις των καρπών που εκδηλώνονται με βαθύνσεις και εξογκώματα στην επιφάνεια τους. (Παπαπαναγιώτου, 2005; Παναγόπουλος, 2000)

1.3 ΑΦΙΔΕΣ

Οι αφίδες (ή μελίγκρες) ανήκουν στην τάξη των Ημιπτέρων, υποτάξη Homoptera, σειρά Sternorrhyncha. Στην ίδια υποτάξη ανήκουν (κοινή ονομασία) οι ψύλλες, οι αλευρώδεις, οι ψώρες (κοκκοειδή). Όσα έντομα ανήκουν σε αυτή την υποτάξη χαρακτηρίζονται από το μικρό τους μέγεθος (1-8mm), έχουν στοματικά μόρια νύσσοντος μυζητικού τύπου και ο βιολογικός τους κύκλος περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια, 'ωό-νύμφη (ηλικίες)-ακμαίο', συνεπώς κατατάσσονται στα ατελή-ετερομετάβολα έντομα (Ηλιόπουλος, 2009).

Οι αφίδες ή μελίγκρες (2.250 είδη) είναι μικρού μεγέθους έντομα (1-5 mm) με μαλακό και αχλαδόμορφο σώμα. Έχουν μακριά πόδια και κεραίες και μακρύ μυζητικό ρύγχος. Στις αφίδες υπάρχουν άτομα πτερωτά και άτομα άπτερα. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν κυρίως τα αρσενικά άτομα και μερικά παρθογενετικά θηλυκά. Η κοιλία φέρει δύο αποφύσεις στα πλάγια, τα κέρατια ή σιφώνια τα οποία εκκρίνουν μια πτητική ουσία (β -farnesene) για την άμυνα του εντόμου (alarm pheromone, φερομόνη συναγερμού) (Ηλιόπουλος, 2009).

Τα έντομα αυτής της υποτάξης είναι φυτοφάγα, ενώ άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα της προσβολής τους αποτελεί η έκκριση μελιτώματος που περιέχει άπεπτα σάκχαρα προερχόμενα από την τροφή τους. Πάνω στο μελίτωμα αναπτύσσονται μύκητες καπνιάς που επηρεάζοντας δυσμενώς τις φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού, όπως τη φωτοσύνθεση και τη διαπνοή των προσβεβλημένων φυτών. Οι αφίδες βλάπτουν τις καλλιέργειες και με έμμεσο τρόπο μεταδίδοντας ιούς. Κάθε είδος αφίδας έχει διαφορετική απόδοση στη μετάδοση του ιού αναλόγως με τον ξενιστή αλλά και το στέλεχος του ιού. Για παράδειγμα, σε πειράματα που διεξήχθησαν από τον Garzo κ.ά. (2004) για την μεταδοτικότητα των ιών CMV, ZYMV και WMV από τα είδη αφίδων *A. gossypii*, *A. craccivora*, *M. persicae* και *A. fabae* σε φυτά πεπονιάς, τα είδη *A. gossypii* και *M. persicae* αξιολογήθηκαν ως αποτελεσματικές στη μετάδοση των ιών ZYMV και WMV, ακολουθούμενες σε βαθμό αποτελεσματικότητας από τις *A. craccivora* και *A. fabae*. Όμως, είδη που παρουσιάζουν υψηλούς πληθυσμούς πτερωτών ατόμων και έντονη πτητική δραστηριότητα ακόμα κι αν η ικανότητα μετάδοσης που τα χαρακτηρίζει δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή, είναι ικανές να συμβάλλουν στην εξάπλωση της ασθένειας (Garzo κ.ά, 2004). Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα που επιδεικνύουν οι αφίδες στη μετάδοση του ιού εξαρτάται από τη σύνθεση του πληθυσμού των αφίδων η οποία με τη σειρά της επηρεάζεται από

τις παρακείμενες καλλιέργειες και την παρουσία αυτοφυών φυτών. Επίσης, διαμορφώνεται από τις ημερομηνίες φύτευσης των καλλιεργειών αλλά και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (θερμοκρασία, υγρασία) που επηρεάζουν το ύψος των πληθυσμών, αλλά και τη συμπεριφορά των αφίδων (Gildow κ.ά., 2008).

1.3.1 *Aphis craccivora* Koch

Είναι πολυφάγο είδος με έντονη τροφική προτίμηση σε φυτά της οικογένειας Leguminosae. Οι νεαρές αποικίες συγκεντρώνονται στην επάκρια βλάστηση των φυτών-ξενιστών και συνήθως προσελκύουν μυρμήγκια. Είναι αφίδα μικρού μεγέθους.

Μορφολογία

Το άπτερο παρθενογενετικό θηλυκό έχει μήκος σώματος 1,4-2,1 mm και γενικό χρώμα μαύρο γυαλιστερό, εκτός από τους ταρσούς και τα δύο πρώτα άρθρα των κεραιών που είναι ανοιχτόχρωμα. Τα σιφώνια έχουν μήκος 0,35-0,40 mm και οι κεραίες έχουν μήκος όσο τα 2/3 του σώματος. Η ουρά είναι μαύρη και στενόμακρη. Τα σιφώνια είναι παχιά και κυλινδρικά και συνήθως μακρύτερα από το τρίτο άρθρο της κεραίας (Τζανακάκης, 1980). Τα ανήλικα στάδια είναι σκοτεινοπράσινα, ενώ όσο προχωρούν σε ηλικία αποκτούν σκοτεινότερο χρωματισμό, καλύπτονται δε ελαφρά από κηρώδη ουσία. Τα περωτά άτομα έχουν μήκος 1,4-1,9 mm. Τα αυγά είναι μαύρα και οβάλ. Διαχειμάζει στο στάδιο του αυγού σε νεαρά φυτά μηδικής. Επίσης διαχειμάζει στην ακακία και σε πολυετή φυτά ζιζανίων. Εκκόλαψη των προνυμφών παρατηρείται τον Φεβρουάριο-Απρίλιο. Η μετανάστευση-διασπορά των περωτών ατόμων του είδους παρουσιάζει σημαντική έξαρση από τα μέσα του Απριλίου.

Η προέλευση του *Aphis craccivora* είναι πιθανότατα από την παλαιοαρκτική, θερμή εύκρατη ζώνη. Πλέον, είναι ένα κοσμοπολίτικο είδος, παρουσιάζει δε ιδιαίτερα έντονη παρουσία στις τροπικές περιοχές του πλανήτη.



Εικόνα 4. Ενήλικο άπτερο άτομο της αφίδας της μηδικής, *Aphis craccivora* Koch (Πηγή: AgroAtlas)

Το είδος προσβάλλει μεγάλο αριθμό φυτών, καλλιεργούμενων και αυτοφυών, με ιδιαίτερη τροφική προτίμηση για τα ψυχανθή. Έχουν αναφερθεί προσβολές του εντόμου σε γαρυφαλλιά, βαμβάκι, αγγελική, εσπεριδοειδή, χαρουπιά κ.ά. (Τζανακάκης, 1980). Είναι είδος ζωοτόκο και πολλαπλασιάζεται παρθενογενετικά όλο το έτος. Διαχειμάζει ως παρθενοτόκο θηλυκό στον λαιμό των φυτών της μηδικής και άλλων ψυχανθών Όταν επικρατήσουν ευνοϊκές συνθήκες (θερμοκρασία γύρω στους 20°C και κατάλληλη σχετική υγρασία), πολλαπλασιάζεται ταχύτατα, δημιουργώντας πυκνές αποικίες επί των προσβεβλημένων φυτών. Το είδος *A. craccivora* μπορεί να συμπληρώσει 15-20 γενεές κατά τη διάρκεια ενός έτους. Το βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών για την αναπαραγωγική δραστηριότητα του είδους επί φυτών μηδικής κυμαίνεται μεταξύ 18 και 24°C. (Παπαπαναγιώτου, 2005).

Συμπτώματα-Ζημιές προσβολής

Η αφίδα απομυζεί τον φυτικό χυμό προκαλώντας κιτρίνισμα του φυλλώματος, εξασθένηση και γενικότερη ανασχεση της ανάπτυξης των προσβεβλημένων φυτών. Το σάλιο της αφίδας περιέχει τοξίνες οι οποίες εγχύονται στο εσωτερικό των φύλλων

τα οποία καρουλιάζουν και ξηραίνονται. Η φυλλική επιφάνεια καλύπτεται με τα μελιτώματα των αποικιών της αφίδας (σάκχαρα από τον φυτικό χυμό που απομυζείται από τα έντομα και αποβάλλονται από το σώμα τους). Επί του θρεπτικού υποστρώματος του μελιτώδους εκκρίματος αναπτύσσονται μύκητες καπνιάς, μειώνοντας δραστικά τη φωτοσυνθετική επιφάνεια αλλά και τη διαπνοή των φυτών. Εξαιρετικά επιζήμια για τις καλλιέργειες είναι η μετάδοση ιών που προσλαμβάνονται κατά τα νύγματα δοκιμασίας και την τροφική δραστηριότητα που πραγματοποιούν με τα στίλετα τους επί μολυσμένων και υγιών φυτών.

1.4 ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΦΙΔΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΩΝ ΜΗ ΕΜΜΟΝΩΝ ΙΩΝ

Σε γενικές γραμμές, η καταπολέμηση των ιών, ιδιαίτερα αυτών που μεταδίδονται μέσω αφίδων με μη έμμονο τρόπο, αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση. Νύγματα δοκιμασίας του εντόμου-φορέα διάρκειας ελάχιστων δευτερολέπτων ή λεπτών επί των μολυσμένων φυτών είναι αρκετά για την πρόσληψη των ιών, ενώ η άμεση επανάληψη της διαδικασίας επί υγιών φυτών προκαλεί τη μόλυνσή τους, καθώς δεν απαιτείται η παρέλευση λανθάνουσας περιόδου για να καταστεί το έντομο μολυσματικό.

Καταρχάς, είναι επιβεβλημένη η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (μεταφύτευση υγιών φυταρίων), απαλλαγμένου από μολύνσεις. Δεύτερον, τα μολυσμένα φυτά πρέπει να εκριζώνονται και να καταστρέφονται (Παπαπαναγιώτου, 2005). Ορισμένοι ιοί χάνουν τη μολυσματική τους ικανότητα εφόσον τα φυτά υποβληθούν σε θερμοκρασιακή μεταχείριση που έγκειται στην εμβάπτιση διαχειμαζόντων πολλαπλασιαστικών οργάνων σε νερό θερμοκρασίας 35-54°C για κάποια λεπτά ή και ώρες, ενώ τα αναπτυσσόμενα φυτά διατηρούνται σε θερμοκρασία 35-40°C από ημέρες έως και εβδομάδες, έως ότου ο ιός αδρανοποιηθεί (Τζάμος, 2007).

Η καταπολέμηση έγκειται κυρίως στην καταπολέμηση των αφίδων-φορέων. Για αυτό τον σκοπό συνιστώνται εφαρμογές ορυκτελαίων τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στη μείωση της μετάδοσης. Παρουσιάζουν όμως μειονεκτήματα λόγω φυτοτοξικότητας και αυξημένου κόστους εφαρμογής.

Συνιστάται επίσης η εφαρμογή ολοκληρωμένου συστήματος αντιμετώπισης των αφίδων η οποία συμπεριλαμβάνει τη βιολογική τους αντιμετώπιση όπου αυτό καθίσταται δυνατό, καθώς και τη χρήση εντομοπαγίδων συνδυαστικά με την εφαρμογή εντομοκτόνων φιλικών προς το περιβάλλον για την προστασία/μικρότερη δυνατή επίπτωση στους πληθυσμούς και την αποτελεσματικότητα των φυσικών εχθρών τους. Στα πλαίσια της βιολογικής καταπολέμησης, πρέπει να γίνεται ακριβής προσδιορισμός του είδους της αφίδας που έχει αναπτύξει αποικίες στην καλλιέργεια προκειμένου να επιλεγθεί ο κατάλληλος φυσικός εχθρός για την αντιμετώπισή της (Παπαπαναγιώτου, 2005). Οι Saranya et al. (2010) βρήκαν ότι επεμβάσεις ανά διαστήματα 7 ημερών με τους εντομοπαθογόνους μύκητες *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Hirsutella thompsonii* και *Cladosporium*

oxysporum, ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικές για την καταπολέμηση ενηλίκων σταδίων του είδους *Aphis craccivora*.

Εφαρμόζεται επίσης συχνά, και με καλά αποτελέσματα, η μηχανική προστασία των φυτών με τη χρήση εντομοστεγών δικτύων ή πλαστικών στα ανοίγματα αερισμού των θερμοκηπίων σε καλλιέργειες υπό κάλυψη. Συνιστάται επιπλέον η καταπολέμηση και η διαχείριση των ζιζανίων (τα αυτοφυή φυτά αποτελούν εναλλακτικούς ξενιστές των αφίδων και πηγές/δεξαμενές του μολύσματος των ιών). Επιπλέον, έχει δοκιμαστεί σε υπαίθριες καλλιέργειες η εδαφοκάλυψη με διάφορα υλικά όπως αλουμινόχαρτο ή φύλλα πλαστικού. Η αντανακλαστική επιφάνεια αυτών των υλικών, εφόσον διατηρείται καθαρή, μειώνει ή αποπροσανατολίζει σε σημαντικό βαθμό τον αριθμό των πτερωτών ατόμων που επιχειρούν να 'εισβάλλουν' στις καλλιέργειες (Παπαπαναγιώτου, 2005).

Συνιστάται η καλλιέργεια φυτών-φρακτών περιφερειακά της κύριας καλλιέργειας. Τα φυτά που επιλέγονται είναι άνοσα στον ιό και οι εισερχόμενοι πληθυσμοί των αφίδων χάνουν τη μολυσματική τους ικανότητα όσο νύσσουν άνοσα φυτά (Hooks και Fereres, 2006; Παπαπαναγιώτου, 2005).

Ενδεδειγμένη, επιπροσθέτως, είναι η εφαρμογή περιόδου αγρανάπαυσης ή περιόδου όπου δεν καλλιεργούνται ξενιστές. Προτείνεται η αύξηση του μεγέθους των αγροτεμαχίων για να περιορίζεται ο ρυθμός εξάπλωσης του ιού. Ενδείκνυται επίσης η χωρική απομόνωση των καλλιεργειών αποφεύγοντας την εγκατάσταση των νέων καλλιεργειών κοντά σε παλιές καλλιέργειες που είχαν ήδη πληγεί από τον ιό.

Για την χημική καταπολέμηση των αφίδων, είναι διαθέσιμος ικανός αριθμός φυτοπροστατευτικών προϊόντων ευρέος φάσματος τα οποία εν τούτοις, (ειδικά όταν χρησιμοποιούνται σε επαναλαμβανόμενες εφαρμογές), έχουν έντονα αρνητική επίπτωση στους φυσικούς εχθρούς των αφίδων. Αρκετά αποτελεσματική είναι η καταπολέμηση των αφίδων με την εφαρμογή αλάτων λιπαρών οξέων Savona 1%, ενώ αποτελεσματικό (όπου δεν έχουν αναπτυχθεί ανθεκτικές φυλές αφίδων) αποδεικνύεται το εκλεκτό καρβαμιδικό αφιδοκτόνο pirimicarb, καθώς και διάφορες συνθετικές πυρεθρίνες. Για την χημική καταπολέμηση των αφίδων αλλά και άλλων μυζητικών εντόμων έχει γενικευτεί η χρήση νεότερων δραστικών ουσιών που ανήκουν στα νεονικοτονοειδή εντομοκτόνα (imidacloprid, thiamethoxam, acetamiprid, dinotefuran), στα παράγωγα των τετρανικών οξέων (spirotetramat) καθώς και ουσίες (pymetrozine, flonicamid) που δεν είναι νευροτοξικά εντομοκτόνα αλλά προκαλούν τη διακοπή της τροφικής δραστηριότητας των εντόμων που

πεθαίνουν από αστιτία (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010). Κοκκώδη εντομοκτόνα εδάφους αλλά και σπόροι επενδεδυμένοι με χλωρονικοτινιλικά εντομοκτόνα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για μακροπρόθεσμη προστασία μετά τη φύτευση, εφόσον η συγκομιδή είναι προγραμματισμένη να γίνει τουλάχιστον 2 μήνες μετά την εφαρμογή τους (Παπαπαναγιώτου, 2005). Είναι επομένως αναγκαία η επιλογή ενός κατάλληλου, αποτελεσματικού, κατά το δυνατόν εκλεκτικού εντομοκτόνου.

Δεν υπάρχει χημική θεραπεία που να εξουδετερώνει τους ιούς. Έχουν όμως αναπτυχθεί χημικά σκευάσματα όπως η ριμπαβιρίνη (ribavirin) που εφαρμόζονται με ένεση ή ψεκάζονται στο φυτό για την μείωση των συμπτωμάτων ιολογικής προσβολής. Η εφαρμογή ορισμένων ορμονών έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στον περιορισμό του συμπτώματος του νανισμού σε ορισμένα φυτά, αλλά και την υποβοήθηση της έκπτυξης πλάγιων οφθαλμών που αλλιώς θα παρέμεναν σε λήθαργο λόγω της ίωσης (Τζάμος, 2007).

Εξαιρετικά αποδοτική και κατά τεκμήριο αποτελεσματικότερη και οικονομικότερη μέθοδος αντιμετώπισης των ιών των φυτών είναι η επιλογή και χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. Η χρησιμοποίηση δορυφορικού RNA, είτε ως μόλυσμα για τον 'προεμβολιασμό' των φυτών στον αγρό ή εκφραζόμενο σε γενετικώς τροποποιημένα φυτά μπορεί να συμβάλλει στην αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούν τα ιολογικά παθογόνα (Φανουράκης, 2010). Η προκύπτουσα αντοχή ονομάζεται 'αντοχή προερχόμενη από το παθογόνο' (Τζάμος, 2007).

Τέλος, σημειώνεται αύξηση του ερευνητικού ενδιαφέροντος στις δυνατότητες που προσφέρει η τεχνητή επαγωγή της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής (systemic acquired resistance, SAR) των φυτών με τη χρήση χημικών σκευασμάτων έναντι σημαντικού εύρους παθογόνων.

1.5 ΤΟ ΑΜΥΝΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Τα φυτά εξελίσσονται παράλληλα με τα παθογόνα εδώ και εκατομμύρια χρόνια, έχοντας αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας που εξασφάλισαν την επιβίωσή τους. Το παθογόνο, για να προκαλέσει ασθένεια στο φυτό, πρέπει να είναι σε θέση να παρακάμψει τον αμυντικό μηχανισμό του φυτού και να αποδιοργανώσει τις μοριακές, βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες του. Τα φυτά δέχονται προσβολές από μια σειρά παθογόνων μυκήτων, ιών, βακτηρίων κ.ά., από τα οποία συνήθως ανακάμπτουν έχοντας αναπτύξει ένα σύστημα άμυνας που στηρίζεται σε έναν συνδυασμό δομικών στοιχείων, αποτρεπτικών της εισόδου και εξάπλωσης της ασθένειας στον ξενιστή, χημικών (τοξικών) παραγόντων που δρουν δυσμενώς στο παθογόνο, αλλά και ενός επαγόμενου βιοχημικού μηχανισμού. Ο βιοχημικός μηχανισμός 'πυροδοτεί', μέσω της έκφρασης των σχετικών γονιδίων, την τοπική και διασυστηματική παραγωγή ουσιών που είναι ικανές να δράσουν στο παθογόνο είτε τοξικά είτε να δημιουργήσουν συνθήκες δυσμενείς για την ανάπτυξη της παθογόνου δράσης του.

Τρεις είναι οι βασικοί λόγοι που υφίστανται για την αποτυχία ενός παθογόνου να μολύνει ένα φυτό:

- 1) το φυτό δεν πληροί τις προϋποθέσεις, δεν αποτελεί φυτό-ξενιστή.
- 2) Το φυτό διαθέτει ισχυρούς προϋπάρχοντες δομικούς και χημικούς αμυντικούς μηχανισμούς.
- 3) Εφόσον γίνει αναγνώριση του παθογόνου από τον ξενιστή (η διαδικασία αναλύεται στη συνέχεια), πραγματοποιείται έναρξη μηχανισμών άμυνας και σε τοπικό και σε επίπεδο ολόκληρου φυτού (Hammond-Kosack και Jones, 1996).

Από την άλλη μεριά, και τα παθογόνα, στα πλαίσια της αλληλεπίδρασής τους με τα φυτά, 'επινοούν' εναλλακτικούς μηχανισμούς για να επανακτήσουν τη μολυσματική τους ικανότητα. Αυτό εναλλάσσεται διαδοχικά, έτσι ώστε η συνεχής δυναμική μεταξύ παθογόνου-ξενιστή να παράγει πολύπλοκους και εξειδικευμένους μηχανισμούς αλληλοαναγνώρισης και αλληλεπίδρασης. (Agiros, 2005; Hammond-Kosack και Jones, 1997). Τα φυτά διαθέτουν ένα παθητικό αμυντικό σύστημα το οποίο στηρίζεται στην ύπαρξη κατασκευών και φυσικών παραγόντων που λειτουργούν προστατευτικά και το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο έχει διαφοροποιηθεί βιοχημικά στο α) βασικό ανοσοποιητικό σύστημα (basal innate immune system) και β) το ανοσοποιητικό σύστημα που καθορίζεται από τα γονίδια

ανθεκτικότητας (resistance R – gene-mediated innate immune system) (Τζάμος, 2007).

1.5.1 Το παθητικό αμυντικό σύστημα

Το παθητικό αμυντικό σύστημα του φυτού βασίζεται στην ύπαρξη ανατομικών-φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών τα οποία προορίζονται να λειτουργήσουν ως φράγμα στην είσοδο παθογόνων. Οι ανατομικοί και φυσικοί παράγοντες αναφέρονται σε χαρακτηριστικά της φυτικής επιφάνειας, στη λειτουργία και δομή των φυσικών ανοιγμάτων, την κατασκευή του κυτταρικού τοιχώματος κ.ά. που καθιστούν δύσκολη την είσοδο του παθογόνου. Πιο συγκεκριμένα:

- Οι κηρώδεις ουσίες, οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια των φυτικών οργάνων, εμποδίζουν την δημιουργία υμένιου (φιλμ) νερού και τη διατήρηση υγρασίας, συνθηκών που ευνοούν τη βλάστηση και τον πολλαπλασιασμό των αγενών σπορίων των φυτοπαθογόνων μυκήτων, καθώς και την ανάπτυξη βακτηρίων.
- Το πάχος της εφυμενίδας ενισχύει την αντοχή του φυτού στη διάτρηση από τις υφές μόλυνσης των παθογόνων.
- Το πάχος και η σύσταση (εναπόθεση λιγνινών) των εξωτερικών τοιχωμάτων της επιδερμίδας είναι παράγοντες που ενισχύουν τη μηχανική αντοχή εναντίον των μολύνσεων.
- Η μορφολογία των φυσικών ανοιγμάτων, το αν είναι ανοιχτά ή κλειστά, παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτροπή της εισόδου των παθογόνων.
- Η ύπαρξη, εσωτερικά, ξυλοποιημένων αγγείων και σκληρογλυματικών ιστών δυσχεραίνει την επέκταση του παθογόνου (Τζάμος, 2007; Agrios, 2005).

Όταν τα παραπάνω ανατομικά χαρακτηριστικά συνδυάζονται με την παρουσία χημικών, τοξικών (αντιμικροβιακών) ενώσεων, ενισχύεται σημαντικά η παθητική άμυνα του φυτού. Τέτοιες χημικές ενώσεις υπάρχουν στο φυτό ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και ονομάζονται φυτοαντισιπίνες. Σε αυτές συγκαταλέγονται φαινολικές ενώσεις (π.χ. ταννίνες) που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε αναπτυσσόμενα φυτικά όργανα και παρεμποδίζουν τόσο την είσοδο των παθογόνων στους νεαρούς ιστούς όσο και την ενζυματική δράση των

πηκτινολυτικών ενζύμων των παθογόνων. Έχουν εντοπιστεί επίσης πρωτεϊνικές ενώσεις που μπλοκάρουν τη δράση των πρωτεϊνολυτικών ενζύμων των παθογόνων, καθιστούν ημιπερατές τις κυτταρικές μεμβράνες των μυκήτων και είναι σε θέση να αδρανοποιήσουν ξένα προς το φυτό ριβοσώματα (Τζάμος, 2007; Agrios, 2005).

1.5.2 Το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα

Για να ενεργοποιηθεί το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών, απαιτείται να έλθει σε επαφή το παθογόνο με το φυτό-ξενιστή. Η επαφή αποτελεί τον πρώτο στάδιο στη μεταξύ τους επικοινωνία. Για να επιτευχθεί όμως η εγκατάσταση του παθογόνου στον ξενιστή, επιβάλλεται οι δύο οργανισμοί να αλληλοαναγνωριστούν. Για την επίτευξη της αλληλοαναγνώρισης, 'πυροδοτείται' μια σειρά βιοχημικών και μοριακών βημάτων (σταδίων) που επιτρέπει αφενώς στο παθογόνο να εντοπίσει τον ξενιστή του στο περιβάλλον, αφετέρου στο φυτό να προετοιμάσει την άμυνά του. Τα φυτά έχουν αναπτύξει εξελικτικά πολλαπλά 'επίπεδα ανθεκτικότητας' (defense layers) με τα οποία θωρακίζονται από παθογόνα τα οποία δυνητικά είναι σε θέση να τα προσβάλλουν. Για να μπορέσει συνεπώς ένα παθογόνο να προσβάλλει επιτυχώς ένα φυτό-ξενιστή, πρέπει να προσπεράσει τα πολλαπλά στρώματα ανθεκτικότητας και να παρακάμψει του αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού.

Στην αρχή της διαδικασίας της αλληλοαναγνώρισης, βιοχημικοί παράγοντες που ονομάζονται διεγέρτες (elicitors), αναλαμβάνουν δράση για να διεγείρουν ή να καταστείλουν το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα του φυτού. Οι διεγέρτες χρησιμοποιούν εξειδικευμένες πρωτεΐνες (προσδένουσες πρωτεΐνες-binding proteins), οι οποίες αποτελούν τους υποδοχείς-δέκτες στις κυτταρικές μεμβράνες ή το κυτταρόπλασμα των φυτών. Οι δέκτες αυτοί προσλαμβάνουν και μεταφέρουν το μήνυμα της επικείμενης εισόδου και της επακόλουθης μόλυνσης από τον παθογόνο μικροοργανισμό. Ο όρος «διεγέρτης» χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τα μόρια εκείνα που προήγαγαν την παραγωγή φυτοαλεξινών, ενώ πλέον έχει διευρυνθεί η σημασία τους ώστε να συμπεριλάβει όλες τις χημικές ουσίες που ενεργοποιούν τους αμυντικούς μηχανισμούς στο φυτό. Οι διεγέρτες αποτελούνται από μόρια των παθογόνων (εξωγενείς διεγέρτες) και από ενώσεις που απελευθερώνονται από τα φυτά όταν έρχονται σε επαφή με τα παθογόνα (ενδογενείς διεγέρτες). Οι διεγέρτες διαχωρίζονται επίσης επιπλέον σε δύο κατηγορίες, τους γενικούς (general) διεγέρτες

που διεγείρουν το βασικό ανοσοποιητικό σύστημα και τους εξειδικευμένους σε φυλή παθογόνου (race-specific) διεγέρτες που βοηθούν να ενισχυθεί το μήνυμα μόλυνσης.

Οι διεγέρτες δεν επιβάλλεται να βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις ώστε να δράσουν, έχουν κοινή χημική δομή και αποτελούνται από ολιγοσακχαρίτες, πεπτίδια, πρωτεΐνες και λιπίδια. Οι περισσότεροι διεγέρτες περιέχουν συστατικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων, όπως η γλυκάνη, χιτίνη, φλατζελίνη, λιποπολυσακχαρίδια και ονομάζονται όλοι PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns, μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τα παθογόνα). Δεν έχουν βρεθεί PAMPs για τους ιούς (Jones και Dangl, 2006).

1.5.2.1 Το βασικό ανοσοποιητικό σύστημα

Η διαδικασία της διέγερσης ενεργοποιεί το βασικό ανοσοποιητικό σύστημα 10-30 λεπτά μετά την επαφή του φυτού με το παθογόνο. Στις κυτταρικές μεμβράνες των φυτών υπάρχουν πρωτεΐνες που δρουν ως βιοχημικοί υποδοχείς αναγνώρισης ή PRRs (Pattern Recognition Receptors) των γενικών διεγερτών PAMPs. Οι PRRs εν συνεχεία επάγουν τη μεταφορά του σήματος της μόλυνσης στο φυτό.

Έχουν αναγνωριστεί διάφορες πρωτεΐνες γενικών διεγερτών σε κινητικό και βιοχημικό επίπεδο αλλά δεν έχει καταστεί δυνατή η απομόνωση και κλωνοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων που τις κωδικοποιούν. Οι μόνοι υποδοχείς που έχουν κλωνοποιηθεί σήμερα είναι η πρωτεΐνη *FLS2* στην αραβίδοψη (*Arabidopsis thaliana*) και την τομάτα (*Lycopersicon esculentum*) που προσδέεται στον διεγέρτη PAMP φλατζελίνη, καθώς και η πρωτεΐνη *EFR* στην αραβίδοψη που αντιστοιχεί στον βακτηριακό γενικό δείκτη PAMP *EF-Tu*. Μέχρι σήμερα, δεν έχουν εντοπιστεί διεγέρτες για τους ιούς (Τζάμος, 2007).

1.5.2.2 Το ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας

Όπως προαναφέρθηκε, τα PAMPs παράγονται από όλα τα παθογόνα και διεγείρουν τη βασική άμυνα του φυτού. Η ικανότητα πρόκλησης ασθένειας από τα παθογόνα όμως οφείλεται στους ειδικούς διεγέρτες που ονομάζονται τελεστές (effectors). Οι ειδικοί τελεστές έχουν την αποστολή να διαφύγουν του βασικού αμυντικού συστήματος του φυτού, τροποποιώντας διάφορες πρωτεΐνες των φυτών ώστε να ενισχυθεί η δική τους μολυσματική ικανότητα. Οι τελεστές ονομάζονται και

‘γόνοι αμολυσματικότητας *Avr*’, γιατί έχουν την ικανότητα να καθιστούν μια μολυσματική φυλή του παθογόνου μη μολυσματική στον ξενιστή.

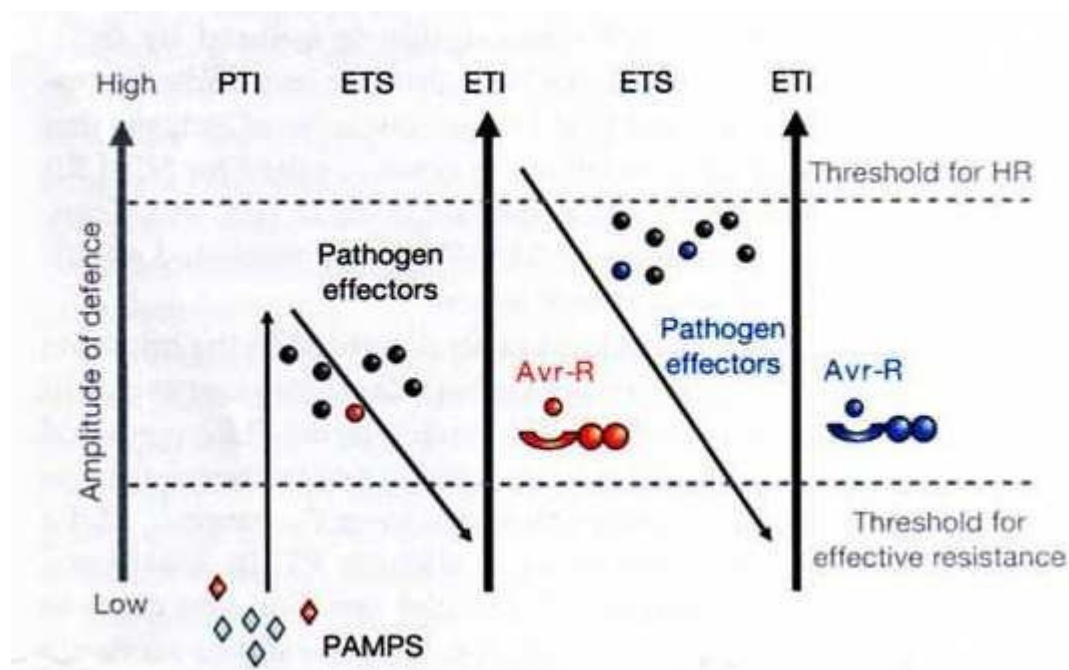
Οι ειδικοί διεγέρτες σύμφωνα με τον Τζάμο (2007), τον Ηλιόπουλο (2004) και τους Hammond-Kosack και Jones (1996):

- πυροδοτούν την αντίδραση υπερευαισθησίας (η οποία αναλύεται παρακάτω).
- επάγουν τη σύνθεση φυτοαλεξινών που σχηματίζονται μετά τη μόλυνση. Πρόκειται για μυκητοστατικές ή βακτηριοστατικές ουσίες, οι οποίες εκδηλώνουν εξειδικευμένη δράση σε παθογόνα, είναι γρήγορες στο σχηματισμό τους ενώ η συγκέντρωσή τους είναι ανάλογη της μολυσματικότητας του παθογόνου.
- επάγουν την παραγωγή γλυκοσυ-υδρολασών που δρουν επιζήμια στην επιφάνεια των παθογόνων.
- επάγουν τη σύνθεση πρωτεϊνών ικανών να εμποδίζουν την ενζυμική δράση των παθογόνων που προκαλεί αποσύνθεση των φυτικών ιστών.
- επάγουν την παραγωγή των δραστικών ομάδων οξυγόνου που είναι επιβλαβείς για πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Η παραγωγή του ενεργού οξυγόνου λαμβάνει χώρα σε μερικά δευτερόλεπτα ή λεπτά μετά την πρώτη επαφή και η απελευθέρωσή του δημιουργεί ελεύθερες ρίζες οι οποίες συμμετέχουν και στην εκδήλωση της υπερευαισθησίας. Απελευθέρωση ενεργού οξυγόνου έχει διαπιστωθεί για παράδειγμα στην πατάτα εναντίον του παθογόνου αιτίου του περονόσπορου πατάτας και τομάτας (*Phytophthora infestans*) και στον καπνό εναντίον του ιού του μωσαϊκού του καπνού (Tobacco mosaic virus, TMV).
- επάγουν την εναπόθεση καλλόζης, λιγνίνης ή γλυκοπρωτεϊνών που ενισχύουν τα κυτταρικά τοιχώματα του φυτού.

Τα φυτά από πλευράς τους έχουν αναπτύξει το ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας για να αντισταθμίσουν τη δράση των τελεστών. Το ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας ενεργοποιείται μία έως δύο ώρες μετά την προκαλούμενη διέγερση. Τα φυτά διαθέτουν τις πρωτεΐνες ανθεκτικότητας *R*, οι οποίες δρουν ως υποδοχείς- ανιχνευτές των τελεστών, ενεργοποιώντας τον μηχανισμό ανοχής στο φυτό. Σε περίπτωση που οι τελεστές δεν αναγνωριστούν, επιτυγχάνεται η εκδήλωση ασθένειας. Συνοπτικώς, η αναγνώριση του μοριακού συμπλόκου *Avr-R* σηματοδοτεί στο φυτό την ανάγκη για την έναρξη

του ενεργητικού μηχανισμού ανοχής. Μέχρι σήμερα, οι τελεστές βακτηρίων, μυκήτων και ιών που έχουν αναγνωριστεί είναι πρωτεϊνικής φύσεως (Jones και Dangl, 2006).

Συνοπτικά, σύμφωνα με τους Jones και Dangl (2006), τα φυτά διαθέτουν ένα αμυντικό σύστημα τεσσάρων φάσεων που ακολουθεί μια πορεία 'ζιγκ-ζαγκ'. Στην πρώτη φάση, τα PAMPs ανιχνεύονται από τους υποδοχείς ανίχνευσης προτύπων (PRRs-Pattern Recognition Patterns). Αυτή η αναγνώριση πυροδοτεί την PTI (PAMP-triggered Immunity, ανοσία που προκαλείται/οφείλεται στα PAMPs). Στη δεύτερη φάση, τα παθογόνα επιστρατεύουν τους τελεστές που είναι ικανοί να καταστείλουν την PTI και ενεργοποιούν την ευαισθησία που οφείλεται στους τελεστές ETS (Effector-triggered susceptibility, ευπάθεια που προκαλείται/οφείλεται στους τελεστές). Στην τρίτη φάση, ο εκάστοτε τελεστής αναγνωρίζεται από την αντίστοιχη εξειδικευμένη πρωτεΐνη-υποδοχέα, πρωτεΐνη *R* και σηματοδοτείται η ETI (Effector-triggered immunity, ανοσία που οφείλεται στους τελεστές). Στην τελευταία φάση, το παθογόνο αναγκάζεται να αναζητήσει τρόπους να αντιμετωπίσει την πιο εξελιγμένη και εξειδικευμένη άμυνα του φυτού απορρίπτοντας τους τελεστές που 'αποκαλύφθηκαν', τροποποιώντας τους ή ανευρίσκοντας άλλους (Jones και Dangl, 2006). Στο σχήμα 1 αποδίδονται οι τέσσερις φάσεις που επιστρατεύει το αμυντικό σύστημα των φυτών στην προσπάθεια που καταβάλλει να μην επιτρέψει την προσβολή τους από τα παθογόνα.



Σχήμα 1. Απεικόνιση του αμυντικού συστήματος τεσσάρων φάσεων των φυτών (Jones και Dangl, 2006)

1.5.2.3 Η θεωρία του ‘γονίδιο-προς-γονίδιο’ και η υπόθεση του φρουρού

Η προαναφερθείσα διαδικασία αντιστοιχεί στη θεωρία γονίδιο-προς-γονίδιο η οποία αναπτύχθηκε από τον Flor το 1971 και διατυπώνει τη σχέση αλληλοαναγνώρισης μεταξύ μιας πρωτεΐνης του παθογόνου που στοχεύει στην πρόκληση ασθένειας και εκφράζεται από ένα κυρίαρχο γονίδιο μη μολυσματικότητας *Anr*, και μίας εξειδικευμένης πρωτεΐνης του φυτού που εκφράζεται από ένα κυρίαρχο γονίδιο ανθεκτικότητας *R*. Όταν ένα από τα δύο γονίδια δεν εκφράζεται, τότε δεν επιτυγχάνεται αλληλοαναγνώριση και εκδηλώνεται η ασθένεια γιατί η σχέση παθογόνου-ξενιστή είναι συμβατή. Στην αντίθετη περίπτωση που γίνεται αναγνώριση, δεν υφίσταται συμβατή σχέση μεταξύ παθογόνου και ξενιστή και η μη συμβατότητα εκδηλώνεται ως ανοχή που εκφράζεται κυρίως με την αντίδραση της υπερευαισθησίας.

Μια πιο πρόσφατη υπόθεση που έχει διατυπωθεί και συνάδει με τη θεωρία γονίδιο-προς-γονίδιο, υποστηρίζει ότι πέρα από το ρόλο τους να προσδένονται και να αναγνωρίζουν τελεστές, οι πρωτεΐνες ανθεκτικότητας *R* μπορεί να αναγνωρίζουν και να δρουν ως ‘φρουροί’ για μία άλλη πρωτεΐνη του φυτού που αποτελεί στόχο για το παθογόνο. Η υπόθεση αυτή ονομάζεται ‘υπόθεση του φρουρού’ (guard hypothesis) και συμβαίνει, για παράδειγμα, στην περίπτωση της τομάτας και του μύκητα *Fulvia fulva*, παθογόνου αίτιου της ασθένειας κλαδοσπορίωση της τομάτας. Εκεί ο τελεστής *Anr2* του μύκητα εκκρίνεται από τον μύκητα στον αποπλαστικό χώρο των φυτών της τομάτας και αλληλεπιδρά με την εξωκυτταρική πρωτεΐνη της κυστεΐνης *Rcr3* της τομάτας, δημιουργώντας το σύμπλοκο *Rcr3-Anr2*. Το σύμπλοκο αυτό, στη συνέχεια και μαζί με την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας *CF-2* της τομάτας, ενεργοποιεί το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα και την αντίδραση της υπερευαισθησίας (Τζάμος, 2007).

Στους ξενιστές τα γονίδια της ανθεκτικότητας είναι κυρίαρχα (*R*) και τα γονίδια της μη-ανθεκτικότητας υπολειπόμενα (*r*), ενώ στο παθογόνο τα γονίδια της αμολυσματικότητας είναι κυρίαρχα (*A*) και τα γονίδια της μολυσματικότητας είναι υπολειπόμενα (*r*) (Hammon-Kosack και Jones, 1996).

Παρά τη μεγάλη διαφοροποίηση που υφίσταται μεταξύ των παθογόνων όσον αφορά στις ιδιότητες των τελεστών, τα γονίδια ανθεκτικότητας των φυτών κωδικοποιούν πέντε κατηγορίες πρωτεϊνών-υποδοχέων (ανεξάρτητα από το είδος του παθογόνου). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναγνωριστεί και απομονωθεί πολλά γονίδια ανθεκτικότητας από μια σειρά καλλιεργούμενων φυτών, μεταξύ των οποίων και από το πρότυπο φυτό αραβίδοψη, *Arabidopsis thaliana* (Τζάμος, 2007).

Μια σειρά γεγονότων ακολουθούν την αλληλοαναγνώριση των τελεστών και πρωτεϊνών ανθεκτικότητας, τόσο σε βασικό όσο και σε εξειδικευμένο επίπεδο, για τη μεταγωγή των μοριακών σημάτων και την τελική εκδήλωση της άμυνας του φυτού. Οι μεταβολές περιλαμβάνουν την 'οξειδωτική έκρηξη' των ενεργά αντιδρώντων ριζών οξυγόνου, την αυξημένη διαμεμβρανική ροή ιόντων ασβεστίου, καλίου και υδρογόνου, την αλκαλίωση του εξωκυττάριου χώρου, την αποδιοργάνωση μεμβρανών και κυτταρικών οργανιδίων, την ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων με την εναπόθεση διαφόρων υλικών, την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών όπως οι φυτοαλεξίνες και την επαναπρογραμματισμένη μεταγραφή του φυτικού κυττάρου. Παρατηρείται δηλαδή μια μεθοδική αναδιοργάνωση για τη θωράκιση του φυτικού οργανισμού (Τζάμος, 2007).

1.5.2.4 Αντίδραση υπερευαισθησίας

Το 1915 ο Stackman όρισε την αντίδραση/ανταπόκριση Υπερευαισθησίας-AY (Hypersensitive Response-HR) ως την ταχεία νέκρωση των κυττάρων σε ορισμένες ποικιλίες σιτηρών που είναι ανθεκτικές σε προσβολές μυκήτων-παθογόνων αιτιών των σκωριάσεων. Στα πλαίσια της αντίδρασης υπερευαισθησίας (η οποία εκδηλώνεται κατά την άμυνα που προτάσσουν τα φυτά εναντίον μυκητολογικών, βακτηριολογικών και ιολογικών προσβολών), προκαλείται ο ταχύτατος θάνατος των κυττάρων του ξενιστή, ο οποίος εκδηλώνεται με την καταστροφή της πολικότητας της κυτταρικής μεμβράνης, την καταστροφή της ημιπερατότητάς της, καθώς και με άλλες φυσιολογικές και βιοχημικές αλλαγές (Τζάμος, 2007). Είναι ένα είδος 'αυτοκτονίας' ενός ή περισσότερων κυττάρων που έχουν δεχθεί την προσβολή ώστε να αποτραπεί η μεταφορά και ο πολλαπλασιασμός του παθογόνου στους υπόλοιπους ιστούς του ξενιστή. «Φαίνεται ότι η αντίδραση της υπερευαισθησίας είναι ένας προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Programmed Cell Death)...» (Τζάμος, 2007).

Η αντίδραση/ανταπόκριση υπερευαισθησίας (AY) δεν ανταποκρίνεται καλά σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και μπορεί να έχει περιορισμένη απόδοση. Επίσης, η AY δεν εκδηλώνεται πάντα συνέπεια της προσβολής ενός φυτού από κάποιο παθογόνο. Είναι πολύ πιθανόν ότι αν και τα γονίδια ανθεκτικότητας πυροδοτούν τις διαδικασίες για την εξέλιξη της AY, κάποιες άλλες αντιδράσεις είναι τόσο αποτελεσματικές που δεν είναι πλέον αναγκαίος ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. (Hammond-Kosack και Jones, 1997). Η επαγωγή της AY από τους ιούς λαμβάνει χώρα αφού εισέλθουν στο φυτό, πολλαπλασιαστούν και μετακινηθούν σε γειτονικά κύτταρα μέσω των πλασμοδεμάτων.

1.6 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΤΟΧΗ (SAR)

Έχει παρατηρηθεί εδώ και χρόνια και έκτοτε ερευνάται εκτεταμένα, το φαινόμενο ένα φυτό, μετά από προσβολή από παθογόνο σε κάποιο τμήμα του, να παρουσιάζει μελλοντική ανθεκτικότητα όχι μόνο στο συγκεκριμένο παθογόνο αλλά και σε άλλα φυτοπαθογόνα όπως ιοί, βακτήρια, μύκητες. Μάλιστα η ανθεκτικότητα αυτή επεκτείνεται σε όλο το φυτό, έχει δηλαδή διασυστηματικό χαρακτήρα (Φανουράκης, 2010).

Η Επίκτητη ή Επαγόμενη Διασυστηματική Αντοχή (systemic acquired resistance), η οποία ακολουθεί την ΑΥ και αποτελεί μια μακροπρόθεσμη και γενική ανθεκτικότητα, αναφέρεται στην ενεργοποίηση των λανθανόντων μηχανισμών ανθεκτικότητας. Ως αντικείμενο έρευνας άνοιξε το 1961 με τον Ross ο οποίος διαπίστωσε ότι κατόπιν πρόκλησης μολύνσεων στα φύλλα καπνού με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV), τα ανώτερα φύλλα παρουσίασαν μειωμένη μόλυνση σε επακόλουθες προσβολές με τον ίδιο ιό (Τζάμος, 2007). Τη συνέχεια της έρευνας ανέλαβε δυναμικά ο Kuc και η ομάδα του στις δεκαετίες του 1980 και 1990 (Kuc, 1987; 1990) οι οποίοι μελέτησαν και παρατήρησαν τη διασυστηματική ενεργοποίηση μηχανισμών αντοχής σε προσβολές ιών, μυκήτων και βακτηρίων.

Σε αρχικά πειράματα βιολογικής διεγέρσεως λανθανόντων μηχανισμών αντοχής χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγγουριάς τα οποία μολύνθηκαν με τους μύκητες *Cladosporium cucumericum* και *Colletotrichum lagenarium*, με το βακτήριο *Pseudomonas lachrymans* και τον ιό TMV, σε διαφορετικές ποσότητες αιωρήματος του κάθε φυτοπαθογόνου. Διαπιστώθηκε ότι ανάλογα με την ποσότητα του εφαρμοζόμενου φυτοπαθογόνου, διαφοροποιείται και ο βαθμός ανοσοποίησης. Αρχικά μολύνεται το πρώτο φύλλο της αγγουριάς στο στάδιο των δύο πρώτων φύλλων. Το πρώτο φύλλο ονομάζεται 'φύλλο διεγέρσεως'. Τέσσερις με πέντε ημέρες αργότερα και εφαρμόζοντας το ίδιο παθογόνο στην ίδια ποσότητα, μολύνεται και το δεύτερο φύλλο το οποίο ονομάζεται 'φύλλο προκλήσεως'. Η διαδικασία αυτή καταλήγει στην προστασία του δεύτερου φύλλου αλλά και των φύλλων που εκτύσσονται και αναπτύσσονται στα επακόλουθα στάδια ανάπτυξης των φυτών αγγουριάς. Η ένδειξη ανοσοποίησης στηρίζεται στον μειωμένο αριθμό νεκρωτικών κηλίδων αλλά και στην περιορισμένη έκταση που καταλαμβάνουν (Τζάμος, 2007).

Ο όρος Επίκτητη Διασυστηματική Αντοχή (Systemic Acquired Resistance/SAR), αναφέρεται στην ανθεκτικότητα που παρουσιάζει το φυτό κατόπιν

μολύνσεώς του με ένα παθογόνο, ενώ ο όρος Επαγόμενη Διασυστηματική Αντοχή (Induced Systemic Resistance, ISR), χρησιμοποιείται στην περίπτωση που ο ξενιστής καθίσταται ανθεκτικός μέσω βιολογικών παραγόντων που δεν προκαλούν νέκρωση, όπως τα ριζοβακτήρια. Για λόγους συντομίας, η ονομασία ‘Επίκτητη Διασυστηματική Αντοχή’ αντικαθίσταται συχνά από τον όρο ‘ανοσοποίηση’ (Τζάμος, 2007). «Σήμερα θεωρείται ότι η ‘αφύπνιση’ λανθανόντων μηχανισμών αντοχής επάγεται ή αποκτάται κατόπιν διαγέρσεως, οπότε και τα δύο φαινόμενα είναι μια μορφή ανοσοποίησης με διαφορετικούς παράγοντες διεγέρσεως και με ίδιους ή διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής» (Τζάμος, 2007). Η ύπαρξη της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής υποδηλώνει την ύπαρξη ‘μνήμης’ στα φυτά, ένας μηχανισμός που αξίζει να διερευνηθεί εκτενέστερα (Conrath, 2006).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται σειρά πειραμάτων και μελετών που επικεντρώθηκαν στην παρατήρηση και κατανόηση της φυσιολογίας του εν λόγω φαινομένου. Έχουν χρησιμοποιηθεί μολυσμένα τμήματα φυτού για τη μόλυνση υγιών φυτών, μέσω εμβολιασμού αλλά και με άλλους τρόπους. Μετά από έκθεση των φυτών στο παθογόνο, παρατηρείται εκδήλωση της SAR και διαπιστώνεται ότι για την εκδήλωση της SAR το σήμα της μόλυνσης διαβιβάζεται από το προσβεβλημένο σημείο στους υπόλοιπους φυτικούς ιστούς. Οι ερευνητές έχουν επίσης διαπιστώσει ότι η διασυστηματική διαβίβαση του μηνύματος μόλυνσης στο φυτό είναι παρόμοιας φύσης στην περίπτωση προσβολής από ένα παθογόνο και στην περίπτωση τραυματισμού του φυτού από κάποια άλλη αιτία. Υπάρχουν ενδείξεις ότι στην σήμανση συναγερμού στο φυτό προκαλούνται φυσιολογικές μεταβολές, όπως εναπόθεση λιγνίνης στα κυτταρικά τοιχώματα, παραγωγή ενζύμων υδρόλυσης ή παραγωγή πρωτεϊνών σχετιζόμενων με την παθογένεση, καθώς και οξειδωτική έκρηξη που παράγει υψηλά επίπεδα ενεργών ομάδων οξυγόνου (Φανουράκης, 2010).

1.6.1 Το Σήμα

Η διέγερση των λανθανόντων μηχανισμών άμυνας καθίσταται δυνατή με το σήμα. Το σήμα, όπως προκύπτει, παράγεται με την εμφάνιση των συμπτωμάτων (νεκρωτικές κηλίδες) που είναι αποτέλεσμα της Αντίδρασης Υπερευαισθησίας με την οποία ανταποκρίνεται το προσβεβλημένο φυτό ή της ασθένειας. Το σήμα ακολούθως μεταβιβάζεται με ταχύ ρυθμό στους υπόλοιπους φυτικούς ιστούς μέσω των αγγείων (ακολουθεί ανοδική κίνηση) πυροδοτώντας την ανοσοποίηση, ενώ το επίπεδο άμυνας

του φυτού αυξάνει όσο το ίδιο το σήμα αυξάνεται και μετακινείται στο φυτό. Τέλος, το μέγιστο επίπεδο προστασίας επιτυγχάνεται εφόσον έχουν κορεσθεί όλοι οι υποδοχείς του φυτού (Kalogirou, 2012; Τζάμος, 2007; Ryals κ.ά., 1996).

Η διαδικασία της ανοσοποίησης τίθεται σε λειτουργία όταν τα μόρια διεγέρσεως ταυτοποιούνται από τους αντίστοιχους υποδοχείς στα φυτά. Τότε ενεργοποιείται η μεταβολική μεταβίβαση του ενδογενούς σήματος το οποίο προορίζεται για να ενεργοποιήσει τα γονίδια που κωδικοποιούν για την παραγωγή αντιμικροβιακών πρωτεϊνών/πεπτιδίων.

Αν και έχει ταυτοποιηθεί η σημασία του σήματος, δε συγκλίνουν οι απόψεις όσον αφορά στη φύση ή τον ακριβή ρόλο που διαδραματίζει. Όσον αφορά το χρόνο που απαιτείται για την παραγωγή του σήματος και την αποτελεσματική επίτευξη ανοσοποίησης, έχει βρεθεί ότι η παρουσία του πρώτου φύλλου (στο οποίο εκδηλώνεται η μόλυνση) στο φυτό είναι απαραίτητη για 72-144 ώρες, καθώς απομάκρυνσή του σε ενδιάμεσο χρονικό διάστημα παρέχει ενδιάμεση προστασία ενώ όταν το προσβεβλημένο φύλλο απομακρύνεται μετά το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα, το παθογόνο δεν προκαλεί την παραγωγή άλλων συμπτωμάτων. Το ελάχιστο διάστημα των 3 ημερών για την ανάπτυξη ανοσοποίησης είναι το διάστημα που αρχίζουν να εμφανίζονται τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας στο πρώτο φύλλο.

Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί κάποιες ουσίες ως σήματα ή φορείς σήματος για τη διέγερση των λανθανόντων μηχανισμών αντοχής των φυτών. Μεταξύ αυτών είναι το σαλυκιλικό οξύ (SA) το οποίο το 1979 εφαρμόστηκε για πρώτη φορά εξωτερικά σε φυτά που είχαν προσβληθεί από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV). Το 1990 διαπιστώθηκε ότι κατόπιν μόλυνσεως φυτών καπνού με τον ιό TMV, η συγκέντρωση σαλυκιλικού οξέος (SA) παρουσίαζε αύξηση στο φυτό τόσο τοπικά όσο και διασυστηματικά (Τζάμος, 2007). Δεν έχει όμως εξακριβωθεί ακόμα με σιγουριά ότι το SA αποτελεί όντως το σήμα. Για παράδειγμα, η αφαίρεση φύλλων αγγουριάς που είχαν μολυνθεί με το βακτήριο *P. syringae* έξι ώρες μετά τη μόλυνση και προτού προλάβει το SA να συσσωρευτεί στον φλοιό, δεν επηρέασε αρνητικά την έκφραση των SAR γονιδίων ή την διασυστηματική συσσώρευση και μεταφορά του σαλυκιλικού οξέος. Αυτό υποδεικνύει είτε ότι το σαλυκιλικό οξύ δεν αποτελεί το σήμα είτε ότι πολύ μικρές ποσότητές του μόνο απαιτούνται για τη μεταβίβαση (Ryals κ.ά., 1996). Επίσης, δεν γνωρίζουμε αν η σύνθεσή του σαλυκιλικού οξέος είναι αποτέλεσμα της ΑΥ ή αν την επάγει. Σε κάθε περίπτωση, το SA θεωρείται

απαραίτητο στη μεταβίβαση του σήματος. (Hammond-Kosack και Jones, 1997; Ryals κ.ά., 1996)

Το κέντρο παραγωγής του SA στο φυτό εντοπίζεται στους χλωροπλάστες των κυττάρων και αποτελεί προϊόν μεταβολισμού. Έχει την ιδιότητα της ταχείας μεταφοράς εντός του φυτού από το σημείο της αρχικής εφαρμογής σε απομακρυσμένους φυτικούς ιστούς. Επίσης, θεωρείται ότι αποτελεί διεγέρτη της συσσώρευσης των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την παθογένεση (PR-πρωτεϊνών, pathogenesis related proteins) (Τζάμος, 2007).

Άλλες ουσίες που θεωρούνται ότι συμμετέχουν στη μετάδοση του σήματος ανοσοποίησης είναι το ιασμονικό οξύ, η συστεμίνη και το αιθυλένιο. Το ιασμονικό οξύ και ο μεθυλιωμένος εστέρας του είναι ενώσεις που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και προωθούν τη γήρανση των φυτικών οργάνων. Μετακινούνται εύκολα στο φυτό τόσο στην αέρια όσο και στην υγρή φάση τους. Το ιασμονικό οξύ φαίνεται ότι δρα ως δευτερογενής επαγωγέας της ανοσοποίησης, προκαλώντας διέγερση κάποιων πρωτεϊνών που ενισχύουν την άμυνα του φυτού, όπως οι θειονίνες στο κριθάρι (*Hordeum vulgare*) και το είδος *Arabidopsis thaliana* (Τζάμος, 2007). Η συστεμίνη είναι ένα πεπτίδιο 18 αμινοξέων που έχει απομονωθεί από την τομάτα και χορηγούμενο σε νεαρά φυτά τομάτας, προάγει τη σύνθεση παρεμποδιστών των πρωτεϊνών. Έχει επίσης την ικανότητα να μετακινείται εντός του φυτού.

Τέλος, το αιθυλένιο, η φυτική ορμόνη που ρυθμίζει το ρυθμό ανάπτυξης του φυτού και τη γήρανση, παράγεται από το φυτό όταν αυτό υφίσταται προσβολή. Επίσης παράγεται όταν εφαρμόζονται ουσίες για τη διέγερση των μηχανισμών άμυνας και επάγει τη σύνθεση μερικών πρωτεϊνών παθογένεσης όπως η χιτινάση, η β-1,3 γλουκανάση και η β-γλουκανάση. Η δράση του αιθυλενίου έγκειται επίσης στο ότι ενεργοποιεί τη διαδικασία δομικών αλλαγών που ενισχύουν την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η παραγωγή και εναπόθεση λιγνίνης. Θεωρείται ότι το αιθυλένιο αποτελεί σήμα για την επαγωγή της ανοσοποίησης αλλά δεν είναι η ουσία διέγερσης των λανθανόντων μηχανισμών άμυνας στα φυτά (Τζάμος, 2007).

1.6.2 Πρωτεΐνες Παθογένεσης (Pathogenesis- related proteins, PR – Proteins)

Κατά την έναρξη της διαδικασίας της ανοσοποίησης ανιχνεύονται οι λεγόμενες πρωτεΐνες παθογένεσης (PR - πρωτεΐνες) οι οποίες συμμετέχουν ενεργά στην 'θωράκιση' του φυτικού οργανισμού εναντίον των παθογόνων. Οι εν λόγω

πρωτεΐνες είναι γενετικά κωδικοποιημένες στο φυτό-ξενιστή αλλά η σύνθεσή τους πραγματοποιείται σε περιπτώσεις στις οποίες το φυτό εκτίθεται σε ποικίλες καταπονήσεις ή σε προσβολή από παθογόνα. Η συσσώρευσή τους εντοπίζεται τοπικά γύρω από τις κηλίδες αλλά παράγονται και διασυστηματικά στο φύλλο προκλήσεως σε ακόλουθη μόλυνση. Η παραγωγή των *PR*-πρωτεϊνών δεν αποτελεί εξειδικευμένο φαινόμενο εφόσον έχουν διαπιστωθεί σε πολλά διαφορετικά είδη διαφόρων βοτανικών οικογενειών. Οι πρωτεΐνες παθογένεσης έχουν μικρό μοριακό βάρος, είναι ανθεκτικές στην πρωτεολυτική διάσπαση, παράγονται στον μεσοκυττάριο χώρο, είναι πολύ διαλυτές στα οξέα, παράγονται σε περιπτώσεις όπου υφίσταται είτε συμβατότητα είτε έλλειψη συμβατότητας μεταξύ παθογόνου αιτίου και φυτού-ξενιστή και έχουν αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση (van Loon και van Strien, 1999).

Οι εν λόγω πρωτεΐνες ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες πράγμα που υποδηλώνει τον γενικό ρόλο που διαδραματίζουν στην προσαρμογή του φυτού σε συνθήκες καταπόνησης λόγω βιοτικών παραγόντων. Η κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών παθογένεσης σε οικογένειες βασίστηκε σε κοινές αλληλουχίες αμινοξέων, στην ιολογική τους σχέση και στη ενζυματική/βιολογική τους δραστηριότητα. Οι πρωτεΐνες παθογένεσης επάγονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις από διαφορετικά σήματα (van Loon και van Strien, 1999).

Οι *PR*-πρωτεΐνες ονομάζονται και *SAR*-πρωτεΐνες και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν ονομάζονται *SAR*-γονίδια. Έχουν ανιχνευθεί στον καπνό, την αραβίδοψη, τομάτα, πατάτα, κολοκυθιά, καρπουζιά, αραβόσιτο, κριθάρι, σιτάρι και το ρύζι. Οι *PR*-πρωτεΐνες δεν παρουσιάζουν αντική δράση με βάση τα μέχρι στιγμής δεδομένα. Στις πρωτεΐνες παθογένεσης ανήκουν οι χιτινάσες και οι β-1,3 γλουκανάσες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να διασπούν την χιτίνη και τη β-1,3-γλουκάνη. Οι ουσίες αυτές είναι βασικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων. Επίσης, τα προαναφερθέντα ένζυμα απελευθερώνουν από τα κυτταρικά τοιχώματα του ξενιστή ή του μύκητα τμήματα γλουκανών τα οποία λειτουργούν ως διεγέρτες για την συσσώρευση φυτοαλεξινών στα φυτά (Τζάμος, 2007). Στον πίνακα 1 παρατίθενται ορισμένες σημαντικές πρωτεΐνες παθογένεσης, ταυτόχρονα με τις ιδιότητες που παρουσιάζουν.

Πίνακας 1. Ομάδες πρωτεϊνών παθογένεσης και οι σημαντικότερες ιδιότητές τους (προσαρμοσμένος από Τζάμο, 2007)

Ομάδες	Ιδιότητες
Pr-1	Άγνωστες
PR-2	B-1,3-γλουκανάσες
PR-3	Χιτινάση τύπου I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Χιτινάση τύπου I, II
PR-5	Thaumatococin-like (η ιδιότητα αυτή δεν έχει πλήρως αποδειχθεί)
PR-6	Παρεμπόδιση πρωτεϊνών
PR-7	Ενδοπρωτεϊνάση
PR-8	Χιτινάση τύπου III
PR-9	Περοξειδάση
PR-10	Ροβονουκλεάση (η ιδιότητα αυτή δεν έχει πλήρως αποδειχθεί)
PR-11	Χιτινάση τύπου I
PR-12	Ντιφενσίνη
PR-13	Θειονίνη
PR-14	Πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων

1.6.3 Μηχανισμοί της SAR των φυτών εναντίον ιολογικών ασθενειών

Το 1929 ο Holmes, ερευνώντας τον ιό TMV, έγινε ο πρώτος επιστήμονας που διέκρινε ότι ένα κυρίαρχο γονίδιο σχετιζόταν με την αντίδραση ανθεκτικότητας του καπνού εναντίον του TMV, ότι δηλαδή η μόλυνση περιορίζεται στις αρχικές εστίες της μόλυνσης δια μέσου της ενεργοποίησης της διαδικασίας ανοσοποίησης. Η αλληλεπίδραση του γονιδίου *N* με τον TMV αντιστοιχεί στη θεωρία του 'γονίδιο-προς-γονίδιο', η οποία καταλήγει συνήθως σε κυτταρική νέκρωση, ήτοι έκφραση της αντίδρασης/ανταπόκρισης υπερευαισθησίας (AY), τοπικά στο φυτό. Αργότερα, ο Ross (1961) ανακάλυψε ότι η ζώνη του ιστού που περιέβαλλε τις νεκρώσεις παρέμενε ανθεκτική σε επακόλουθες μολύνσεις, όχι μόνο από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού, αλλά και εναντίον του ιού της νέκρωσης του καπνού (Tobacco necrosis virus, TNY)

και τον ιό του κροταλισμού του καπνού (Tobacco rattle virus, TRV). Αντίθετα, στη φασολιά παρατήρησε ότι η αντίστοιχη ζώνη προστάτευε το φυτό αποκλειστικά από μελλοντικές προσβολές του TMV. Οι ξενιστές επομένως, κατέληξε, αμύνονται με διαφορετικό τρόπο εναντίον των διαφόρων ιών. Ο Ross καθιέρωσε την θεωρία της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής (Ryals κ.α., 1994, Mandadi και Scholthof, 2013).

Οι φυτικοί ιοί διαχωρίζονται από τους μύκητες και τα βακτήρια γιατί κωδικοποιούν σχετικά λίγες πρωτεΐνες και εξαρτώνται αποκλειστικά από τον κυτταρικό μεταβολισμό του ξενιστή τους για να επιβιώσουν. Στον τομέα της κυτταρικής γενετικής, σημαντικές πρόοδοι στην κατανόηση της αλληλεπίδρασης παθογόνου-ξενιστή έχουν σημειωθεί μελετώντας κυρίως φυτοπαθγόνα βακτήρια και μύκητες (Mandadi και Scholthof, 2013). Οι ιοί, σημειώνουν, δεν θεωρούνται ότι κωδικοποιούν PAMPs ή διεγέρτες (με την κλασσική έννοια), ενώ οι αντιδράσεις ανοσοποίησης που 'πυροδοτούνται' στα προσβεβλημένα φυτά μέσω των *R* πρωτεϊνών δεν κατηγοριοποιούνται ως κλασσικές ETI αντιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, καθώς ιοί δεν διαθέτουν φλατζελίνη ή χιτίνη οι οποίες να λειτουργούν ως PAMPs (όπως συμβαίνει με τους μύκητες και τα βακτήρια), δεν εμπίπτουν στα πλαίσια περιγραφής της λειτουργίας του φυτικού αμυντικού συστήματος, στις ίδιες εννοιολογικές και ορολογικές κατηγορίες (Mandadi και Scholthof, 2013).

Οι ερευνητές υπογραμμίζουν ότι δεν έχει ακόμα διασαφηνιστεί ποια είναι επακριβώς τα πρώτα στάδια ενεργοποίησης του σήματος από τη στιγμή που ο ξενιστής 'αντιλαμβάνεται' την παρουσία του φυτοπαθογόνου ιού. Επίσης, οφείλει να διευκρινιστεί η τυχόν ύπαρξη συγκεκριμένων πρωτεϊνών που προσδένονται στις μεμβράνες του φυτού-ξενιστή, οι οποίες είναι ανάλογες των PRRs. Από τα μέχρι τώρα πειράματα όμως, γνωρίζουμε ότι όπως στην περίπτωση του *N* γονιδίου όταν τα φυτά προσβάλλονται από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV), υφίστανται μηχανισμός αναγνώρισης των *Anr* πρωτεϊνών του ιού η οποία οδηγεί σε ΑΥ και εκδήλωση της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής, SAR. Υπάρχουν επίσης δομές στους ιούς όπως το καψίδιο, τα σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τους ιούς, παρομοίως με τα PAMPs και καθίστανται αναγνωρίσιμα από τον ξενιστή (Mandadi και Scholthof, 2013).

Η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή των φυτών εναντίον ιολογικών ασθενειών στηρίζεται στην παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού του ιού εντός του φυτού αλλά και στην επαγωγή συσσώρευσης των πρωτεϊνών παθογένεσης. Έχει βρεθεί ότι σε φυτά καπνού τα οποία ήταν ήδη ανοσοποιημένα μετά από μόλυνση με

τον TMV υπάρχουν παρεμποδιστές του πολλαπλασιασμού των ιών. Σε επεμβάσεις σε φυτά τομάτας με ΒΤΗ διαπιστώθηκε η δραστηριοποίηση γόνων ανοσοποίησης και η πιθανή τροποποίηση της κατασκευής των πλασμοδεσμάτων ώστε να αποτρέπεται η μετακίνηση των ισοσωματίων από τα μολυσμένα σε υγιή κύτταρα (Τζάμος, 2007).

Κατόπιν αλληλοαναγνώρισης του συμπλόκου *Anr-R* πρωτεϊνών, επέρχονται μεταβολικές αλλαγές στον ξενιστή στα επίπεδα των φυτοορμονών, π.χ. του σαλυκικού ή του ιασμονικού οξέος, καθώς και στα επίπεδα των ενεργών ομάδων οξυγόνου όχι μόνο στα προσβεβλημένα αλλά και στα υγιή μέρη, και προκαλείται ΑΥ (Mandadi και Scholthof, 2013).

1.6.3.1 Αντίδραση Υπερευαισθησίας – Ιοί

Η εκδήλωση της ΑΥ κατόπιν ιικής προσβολής του ξενιστή αποτελεί χαρακτηριστικό και συχνό μηχανισμό άμυνας. Η επαγωγή της ΑΥ λαμβάνει χώρα αφού τα ισοσώματα εισέλθουν στο φυτό, πολλαπλασιαστούν και μετακινηθούν σε γειτονικά κύτταρα μέσω των πλασμοδεμάτων. Κατά την ΑΥ, καταγράφονται μεταβολές στα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου και στην κατάσταση (διαπερατότητα) των μεμβρανών. Παραδείγματος χάριν, οι TMV και η τριστέτσα των εσπεριδοειδών (*Citrus tristeza virus*, CTV) επάγουν την εναπόθεση καλόζης στα πλασμοδέσματα (Mandadi και Scholthof, 2013). Επίσης, κατά την ΑΥ (όπως έχει προαναφερθεί), ενεργοποιούνται ένζυμα που προκαλούν νέκρωση των κυττάρων. Η νέκρωση των κυττάρων, βέβαια, αν και παραδοσιακά σχετίζεται με την ΑΥ και τη SAR, μπορεί να δρα ανεξάρτητα από τη συνολική διαδικασία ανοσοποίησης. Για παράδειγμα, στην πατάτα, η πρωτεΐνη ανθεκτικότητας Rx1 αναγνωρίζει την πρωτεΐνη του καμινιδίου του ιού X της πατάτας (*Potato virus X*, PVX), και εμποδίζει την αντιγραφή του PVX πολύ πριν επέλθει η κυτταρική νέκρωση κατά την αντίδραση υπερευαισθησίας που εκδηλώνουν τα προσβεβλημένα φυτά. Στην τομάτα, επίσης, η πρωτεΐνη ανθεκτικότητας κατά του ιού του μωσαϊκού της τομάτας (*Tomato mosaic virus*, ToMV) αδρανοποιεί την πρωτεΐνη-ρεπλικάση του ιού χωρίς να προκαλείται αντίδραση υπερευαισθησίας (Mandadi και Scholthof, 2013).

1.6.3.2 Ο ρόλος του Σαλυκυλικού Οξέος (Salicylic Acid, SA) στην αντιμετώπιση των ιών

Οι μελέτες υποδεικνύουν ότι το SA αποτελεί έναν κύριο παράγοντα στη μεταφορά του σήματος ανοσοποίησης (Baker κ.ά., 1997). Έτσι, προκαλεί την επαγωγή της επίκτητης διασυστηματικής ανοχής στο φυτό-πρότυπο (*Arabidopsis thaliana*) (Lawton κ.ά., 1995). Στην περίπτωση των ιών, το SA στοχεύει κατά της αντιγραφής του ιού, της δια-πλασμοδετικής μεταφοράς του ή της μετακίνησής του μέσω του αγγειακού συστήματος, πράγμα που επιτυγχάνεται παρεμποδίζοντας ή περιορίζοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τις σχετικές πρωτεΐνες για την αντιγραφή και εξάπλωση του ιού στο φυτό. Επίσης, το SA μπορεί να επάγει τη συσσώρευση ουσιών που περιορίζουν την αντιγραφή και εξάπλωση του ιού (Penazzio και Roggero, 1998). Τα παραπάνω έχουν καταγραφεί σε εργασίες που αφορούν σε επεμβάσεις με SA σε φυτά καπνού εναντίον του ιού TMV. Η επέμβαση με σαλυκυλικό οξύ όχι μόνο παρεμπόδισε την αντιγραφή και τη μετακίνηση του ιού στο φυτό, αλλά παρατηρήθηκε και μείωση της συσσώρευσης του ιικού RNA (Kalogirou, 2012).

Υπάρχουν όμως περιπτώσεις ιών όπου η επέμβαση με σαλυκυλικό οξύ δεν έχει αντίστοιχες επιδράσεις, όπως ισχύει στην περίπτωση του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (Cucumber mosaic virus, CMV) στον καπνό ο οποίος, αν και δεν εξαπλώθηκε διασυστηματικά σε ολόκληρο το φυτό, αντιγράφηκε και πολλαπλασιάστηκε σε τοπικό επίπεδο, χάρη στη δράση της πρωτεΐνης CMV 26. Επομένως, οι ιοί εμφανίζουν διαφορετική ευπάθεια στη δράση του σαλυκυλικού οξέος.

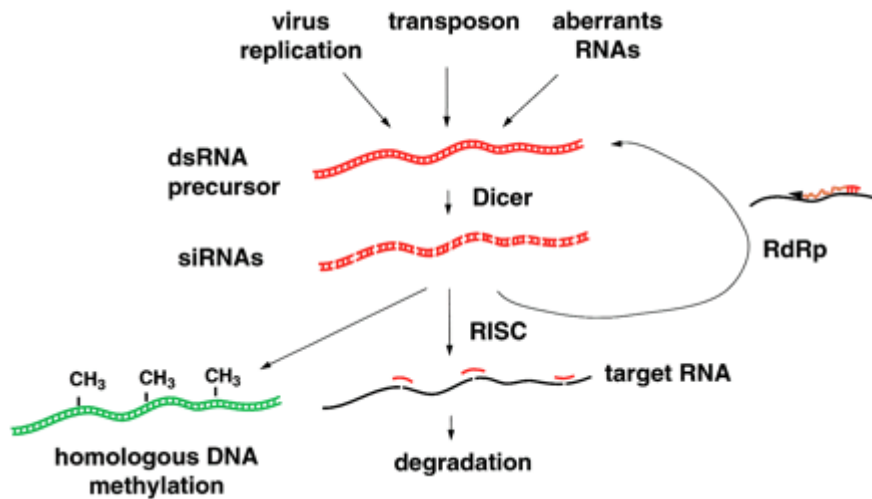
Πιθανολογείται ότι η δράση του σαλυκυλικού οξέος επάγει τη δραστηριότητα της εναλλακτικής οξειδάσης (Alternative Oxidase, AOX) και των σχετικών γονιδίων. Η AOX είναι η τελική οξειδάση στο εναλλακτικό μονοπάτι της αναπνοής, στην ροή των ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Η AOX πιθανώς συμμετέχει στη μεταφορά του σήματος ανοσοποίησης ενεργοποιώντας το εναλλακτικό μονοπάτι της μιτοχονδριακής αναπνοής, καθώς (σε ιστούς που βρίσκονται σε κατάσταση άμυνας εναντίον ιολογικών προσβολών εκδηλώνοντας AY), έχει καταγραφεί έκφραση των *Aox* γονιδίων και συσσώρευση των σχετικών πρωτεϊνών (Kalogirou, 2012).

1.6.3.3 Γονιδιακή αποσιώπηση (RNA silencing)

Για δεκαετίες, επιστήμονες και παραγωγοί παρατηρούσαν ότι τα μολυσμένα φυτά διατηρούσαν την ικανότητα έκπτυξης υγιών φύλλων κορυφής. Το φαινόμενο αυτό που περιγράφηκε ως ‘ανάρρωση’ πιθανώς αποδίδεται στη γονιδιακή αποσιώπηση (RNA silencing), η οποία ως θεωρία κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος. Η γονιδιακή αποσιώπηση αποτελεί αρχαίο κυτταρικό μηχανισμό άμυνας στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. (plant-virus resistance) Ονομάζεται ‘γονιδιακή αποσιώπηση’ στην περίπτωση των φυτών και ‘γονιδιακή εμπλοκή’ στην περίπτωση των θηλαστικών. (Burguán, 2006)

Η γονιδιακή αποσιώπηση είναι ο μηχανισμός που επιστρατεύει το φυτό για να αντιμετωπίζει τις ικές προσβολές. Η γονιδιακή αποσιώπηση έχει σκοπό την αποδόμηση ορισμένων mRNA-στόχων ή την καταστολή της μετάφρασης του mRNA-στόχου. Η γονιδιακή αποσιώπηση λαμβάνει χώρα μετα-μεταγραφικά (post-transcriptional gene silencing) και επάγεται από την παρουσία δίκλωνου RNA. Πιο συγκεκριμένα, οι ιοί επάγουν το σχηματισμό δίκλωνων μορίων RNA στο φυτό τα οποία αναγνωρίζονται από την εξειδικευμένη RNAάση Dicer (που είναι παρούσα σε μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο). Με τη βοήθεια της Dicer, τα δίκλινα μόρια αποδομούνται σε μικρά τμήματα, τα siRNAs (small interfering RNAs) με μέγεθος από 21-24 νουκλεοτίδια. Μια αλυσίδα siRNAs ενσωματώνεται στο RNA επαγόμενο σύμπλοκο αποσιώπησης (RISC, RNA Induced Silencing Complex). Στη συνέχεια, γίνεται αναγνώριση των ομόλογων περιοχών στον mRNA-στόχο, δημιουργώντας δίκλωνες περιοχές, με συνέπεια να αποκόπτεται το mRNA και τελικά να αποδομείται. Δεν είναι γνωστή η πηγή του σήματος που ενεργοποιεί την αποσιώπηση (Muthamilarasan και Prasad, 2013; Chisholm κ.ά., 2006; Soosaar κ.ά., 2005). Στο σχήμα 2 αποδίδεται ο μηχανισμός γονιδιακής αποσιώπησης.

Σχήμα 2. Απεικόνιση μηχανισμού γονιδιακής αποσιώπησης (από Gitlin και Andino, 2003).



Αλλά και οι ιοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς παράκαμψης της γονιδιακής αποσιώπησης, με πρωτεΐνες-καταστολείς (proteins suppressors) της αποσιώπησης οι οποίες κωδικοποιούνται σε ικά γονιδιώματα RNA ή DNA. Οι ικές πρωτεΐνες-καταστολείς λειτουργούν σε 3 επίπεδα:

- 1) αποτρέπουν τη δημιουργία siRNAs
- 2) εμποδίζουν την ενσωμάτωση των siRNAs σε σύμπλοκα τελεστών, και
- 3) παρεμβαίνουν στη λειτουργία ενός εκ των συμπλόκων τελεστών.

1.6.3.4 Άλλοι μηχανισμοί άμυνας

Πέραν της θεωρίας των κυρίαρχων γονιδίων ανθεκτικότητας και της ΑΥ που φέρεται να επάγεται στο φυτό κατά την προσβολή που υφίσταται από ιούς, έχουν παρατηρηθεί και άλλες αλλαγές και μηχανισμοί στο φυτό που πιθανολογείται ότι συμμετέχουν στην ανοσοποίησή του.

- Έχει παρατηρηθεί απώλεια της λειτουργίας ορισμένων πρωτεϊνών του ξενιστή που θα έπαιζαν ρόλο-κλειδί στην επιτυχή εγκατάσταση του παθογόνου. Συγκεκριμένα, μεταβάλλονται αμινοξέα ώστε τα κύτταρα του ξενιστή αδυνατούν πλέον να μεταφράσουν επαρκώς τις ικές πρωτεΐνες, δημιουργώντας έτσι εμπλοκή στην αντιγραφή και μετακίνηση του ιού.
- Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες, όπως οι λεκτίνες του τύπου C που αναγνωρίζουν τα PAMPs των μυκήτων. Στα φυτά, προσδένονται σε μόρια μονο- ή ολιγοσακχαριτών ώστε να είναι σε θέση να διαχωρίζουν τους

υδρογονάνθρακες του ξενιστή από εκείνους του παθογόνου και να πραγματοποιούν αναγνώρισή τους (Mandadi και Scholthof, 2013).

1.6.3.5 Ο ρόλος των αφίδων στην επαγωγή της ανοσοποίησης

Το στίλετο των στοματικών μορίων των αφίδων διαπερνά τα κυτταρικά στρώματα της επιδερμίδας και του μεσόφυλλου. Κατά την τροφική τους δραστηριότητα εκκρίνεται σάλιο το οποίο περιέχει περοξειδάσες, β-γλουκοσυδάσες και άλλα ένζυμα τα οποία ενδέχεται να στέλνουν σήμα στον φλοιό του φυτού και να συμβάλλουν έτσι στην επαγωγή των λανθανόντων μηχανισμών άμυνας, όπως συμβαίνει και με τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Βρέθηκε ότι οι αφίδες επάγουν, τοπικά και διασυστηματικά, αύξηση της mRNA μεταγραφής ή/και της ενζυματικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών παθογένεσης, όπως οι περοξειδάσες και οι χιτινάσες. Πρόσφατα ευρήματα καταδεικνύουν το ρόλο του σάλιου και της πέψης στην επαγωγή μιας σειράς αμυντικών αντιδράσεων, ακόμα και στην περίπτωση ενός αυστηρά τοπικού ενδοκυτταρικού τραύματος που προκαλείται από το στίλετο των εντόμων. Σε φυτά αραβίδωσης (*Arabidopsis thaliana*) η δράση της αφίδας της ροδακινιάς (*Myzus persicae*) επάγει την σύνθεση σαλυκυλικού οξέος (SA) και την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών παθογένεσης (PR-proteins) (Moran και Thompon, 2001).

1.6.4 Παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη διέγερση της ανοσοποίησης

Η διασυστηματική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής προϋποθέτει την ενεργοποίηση ή την παραγωγή σήματος το οποίο θα διαβιβαστεί στους υπόλοιπους φυτικούς ιστούς ώστε να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός άμυνας. Το μονοπάτι της SAR ενεργοποιείται με τη δημιουργία νεκρώσεων ως αποτέλεσμα είτε της ΑΥ είτε ως σύμπτωμα της προσβολής των φυτοπαθογόνων. Με την ενεργοποίηση της SAR, η σχέση παθογόνου-ξενιστή που υπό φυσιολογικές συνθήκες θα ήταν συμβατή, μετατρέπεται σε ασύμβατη (Ryals κ.ά., 1996).

Πέραν των παθογόνων αιτιών των ασθενειών που προσβάλλουν τα καλλιεργούμενα φυτά, η ενεργοποίηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας πραγματοποιείται και μέσω βιολογικών ή χημικών παραγόντων. Στους βιολογικούς συγκαταλέγονται μη παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως τα ριζοβακτήρια τα οποία αποικίζουν την ριζόσφαιρα του φυτού και προκαλούν στα φυτά αντιδράσεις

φαινοτυπικά ίδιες με αυτές της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής, καθώς και επαγόμενη ανθεκτικότητα (ISR) σε βακτήρια, ιούς και μύκητες. Η χρησιμοποίηση στελεχών μη παθογόνων ριζοσφαιρικών βακτηρίων για την προστασία των φυτών από παθογόνα στηρίζεται στην ικανότητα των βακτηρίων αυτών να παράγουν αντιβιοτικά καθώς βρίσκονται πάνω στις ρίζες των φυτών περιορίζοντας έτσι την ανάπτυξη του παθογόνου αλλά και διεγείροντας λανθάνοντες μηχανισμούς αντοχής οι οποίοι ενεργοποιούνται διασυστηματικά στο φυτό. Η ανοσοποίηση σε αυτή την περίπτωση λοιπόν εκδηλώνεται με την καθυστέρηση της έκφρασης των συμπτωμάτων αλλά και τη μείωση της έκτασης και έντασης της ασθένειας. Τα ριζοβακτήρια ανήκουν κυρίως στα γένη *Pseudomonas* και *Bacillus* (Ζιώγας, 2010; Τζάμος, 2007).

1.6.4.1 Συνθετικές ενώσεις

Η χρήση συνθετικών ουσιών για τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος των φυτών αποτελεί αυξανόμενη πρακτική με σημαντικά αποτελέσματα, ειδικά σε περιπτώσεις φυτικών ιώσεων. Για να θεωρηθεί μία ουσία ως διεγέρτης του ανοσοποιητικού, θα πρέπει μεταξύ άλλων: α) να ενεργοποιεί την αντοχή του φυτού στο ίδιο φάσμα παθογόνων β) να ενεργοποιεί τους ίδιους βιολογικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στο βιολογικό πρότυπο, γ) να μην έχει άμεση αντιμικροβιακή δράση *in vitro* ή *in vivo* (Kalogirou, 2012).

Πριν διερευνηθεί ο ρόλος του σαλυκυλικού οξέος στη μεταφορά του σήματος της ανοσοποίησης, είχε διαπιστωθεί ότι ενεργοποιεί τη διαδικασία ως διεγέρτης. Η εφαρμογή του υδροξυ-βενζοϊκού οξέος οξέος (hydroxybenzoic acid) και της ακετυλομένης του μορφής (Acetyl Salicylic Acid, ASA) έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει βρεθεί ότι στον καπνό επάγει ανθεκτικότητα κατά του ιού TMV, ενώ αργότερα διαπιστώθηκε ότι επάγει και τη σύνθεση των PR - πρωτεϊνών (Μωραΐτης, 2011).

Επιδιώχθηκε η επαγωγή της SAR σε φυτά αγγουριάς που είχαν μολυνθεί με τον ιό του κίτρινου μωσαϊκού της κοινής κολοκυθιάς (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) χρησιμοποιώντας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ορισμένες χημικές ουσίες όπως θειϊκό κάλιο, θειϊκό μαγνήσιο, θειϊκό αμμώνιο, χηλικό σίδηρο, χηλικό ψευδάργυρο, χηλικό μαγγάνιο και εξωγενές σαλυκικό οξύ. Η αξιολόγηση της επαγωγής της SAR έγινε με γνώμονα την έκταση της ασθένειας, τις βιοχημικές αλλαγές που υφίστανται, όπως τα επίπεδα του ενδογενούς σαλυκυλικού οξέος, τα

επίπεδα πρωτεϊνών και τα επίπεδα των ενζύμων χιτινασών και περοξειδάσης. Βρέθηκε ότι 25 ημέρες μετά τη μόλυνση, το σαλκυλικό οξύ και το θειικό κάλιο ήταν τα πιο επιτυχή σε επίπεδα συγκέντρωσης 0,5% και 3% αντίστοιχα (Abo-Elnasr κ.ά., 2005).

1.6.4.1.1 *Acibenzolar-S-methyl*

Το βενζο-(1,2,3,)-θειαδιαζολ-7-καρβοθειικό οξύ (benzothiadiazole-7-carbothioic acid, BTH) και ο μεθυλεστέρας του (*S*-methyl benzo [1,2,3] thiadiazole-7-carbothioate, ASM) εμπορικά κυκλοφορούν ως σκευάσματα με τις ονομασίες Bion, Actigard και Boost (Μωραΐτης, 2011). Το acibenzolar-*S*-methyl εντάχθηκε εμπορικά στην αγορά το 1996 με την ονομασία **Bion[®]** και παρουσιάζει μεγάλη λειτουργική συσχέτιση με το σαλκυλικό οξύ, επάγοντας την ανθεκτικότητα σε μεγάλο εύρος παθογόνων και τη σύνθεση PR-πρωτεϊνών. Προστατεύει, πιο συγκεκριμένα, το φυτό από βακτήρια, μύκητες και ιούς, ενώ σε διάστημα 4 έως 12 ωρών από την εφαρμογή του ενεργοποιεί τη σύνθεση πρωτεϊνών που κωδικοποιούν χιτινάσες, βασικές γλουκανάσες και όξινες περοξειδάσες. Ακόμα και μετά την παρέλευση διαστήματος 20 ωρών μετά την εφαρμογή του, δεν διαπιστώθηκε μείωση στην έκφραση των PR γονιδίων. Στη χώρα μας χρησιμοποιείται ως ετοιμόχρηστο μείγμα με το μυκητοκτόνο Metalaxyl-M (mefenoxam) της χημικής οικογένειας των φαινυλαμιδίων, για την αντιμετώπιση του περονόσπορου του καπνού (*Peronospora tabacina*) και της βακτηρίωσης του καπνού (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*). Το συγκεκριμένο σκεύασμα μεταβολιζόμενο σε καρβοξυλικό οξύ, μετακινείται συμπλαστικά και αποπλαστικά στο φυτό θέτοντας σε λειτουργία την άμυνά του, όπως γίνεται με το σαλκυλικό οξύ. (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010; Van Rad, 2005).

Η πραγματοποίηση επεμβάσεων με ASM αποδείχθηκε αποτελεσματική για την αντιμετώπιση εδαφογενών παθογόνων (*Pythium*) που προκαλούν σηψιρριζίες και σήψεις λαιμού σε νεαρά σπορόφυτα και μεγαλύτερης ηλικίας φυτά αγγουριάς και σταυρανθών, αντίστοιχα (Benhamou και Belanger, 1998; Jensen κ.ά., 1998), αλλά και για τη διαχείριση των προσβολών του παθογόνου *Rhizoctonia solani* σε φυτά καπνού (Cole, 1999). Επίσης, η εμβάπτιση σπόρων βάμβακος σε διάλυμα της δραστικής ουσίας για διάστημα τριών ωρών πριν τη σπορά τους, συνετέλεσε σε μείωση της έντασης προσβολής των νεαρών φυταρίων βάμβακος από εδαφογενή παθογόνα κατά 33% (Mondal κ.ά., 2005). Σε φυτά αραβίδωσης έχει βρεθεί ότι επάγει την

ανθεκτικότητα του φυτού εναντίον των παθογόνων *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και *Peronospora parasitica*. Στον καπνό επιτυγχάνεται ανοσοποίηση εναντίον των *Cercospora nicotianae*, *Erwinia carotovora*, *Phytophthora parasitica*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* καθώς και του ιού TMV (Μωραΐτης, 2011; Friedrich κ.ά., 1996). Το ASM εφαρμοζόμενο σε φυτά κολοκυθιάς εναντίον του μύκητα *Cladosporium cucumericum*, σε αντίθεση με το σαλκυκικό οξύ που εφαρμόστηκε με ψεκασμό σε φύλλο και του οποίου η δράση περιορίστηκε σε τοπικό επίπεδο, ενεργοποιεί το σήμα της SAR διασυστηματικά, αλλά και την έκφραση του γονιδίου της χιτινάσης η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα σε ασθένειες και έχει ερευνηθεί εκτεταμένα στο κολοκύθι (Narusaka κ.ά., 1999). Το BTH βρέθηκε ότι επάγει την SAR σε φυτά παπάγιας εναντίον του παθογόνου *Phytophthora palmivora*, καθώς αυξάνει την δραστηριότητα των χιτινασών (Zhu κ.ά., 2003).

Έχει επίσης αναφερθεί (Madrigal και Corrales, 2000) η αποτελεσματικότητα του ASM εναντίον των προσβολών που υφίστανται φυτά μπανάνας από το είδος νηματώδη *Radopholus similis*, καθώς και η μείωση της έντασης προσβολής φυτών πατάτας από τον κομβονηνηματώδη *Meloidogyne chitwoodi* μετά από επαναλαμβανόμενες επεμβάσεις φυλλώματος, ενώ η ταυτόχρονη εφαρμογή του με τη δραστική ουσία harpin προκάλεσε μείωση της πυκνότητας νηματωδών του γένους *Pratylenchus* (Collins κ.ά., 2006).

Σημαντική έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ενσωμάτωση του ASM σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων. Ο συνδυασμός επεμβάσεων ASM και βακτηριοφάγων σε μίγματα, μείωσε την ένταση της ασθένειας που προκαλεί στην καλλιέργεια κρεμμυδιού το βακτήριο *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* και αποδείχθηκε ισότιμα αποτελεσματικός με την πραγματοποίηση επαναλαμβανόμενων επεμβάσεων με χαλκούχα σκευάσματα (Lang κ.ά., 2007). Επίσης, η χρησιμοποίηση μιγμάτων του επαγωγέα της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής και μυκητοκτόνων ως αναπόσπαστο τμήμα μιας στρατηγικής διαχείρισης των ασθενειών, παρείχε αποτελεσματική προστασία και συνέβαλλε ταυτόχρονα στην επιβράδυνση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε καλλιέργειες μαρουλιού (Matheron και Porchas, 2000) και σιτηρών (Stadnik και Buchenauer, 1999).

1.6.4.1.2 Laminarin

Ο ολιγοσακχαρίτης laminarin αποτελεί έναν ακόμα επαγωγέα της διασυστηματικής αντοχής των φυτών. Είναι προϊόν εκχύλισης θαλάσσιων φυκών του είδους *Laminaria digitata*, αντιπροσωπεύοντας το 35% του ξηρού τους βάρους. Τόσο το laminarin όσο και το harpin θεωρούνται επίσης ευεργετικά για την ανάπτυξη και παραγωγή των φυτών (Vera κ.ά., 2011; Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010; Peng κ.ά., 2003; Dong κ.ά., 1999). Το laminarin, ως εκχύλισμα, χρησιμοποιούνται από παλιά σε καλλιέργειες για να αυξηθεί η αντοχή τους σε ασθένειες, όπως καλλιέργειες καπνού, ρυζιού και μηδικής. Η δράση του laminarin φαίνεται να ενεργοποιεί την εισροή ιόντων ασβεστίου, να επάγει το φαινόμενο της οξειδωτικής έκρηξης, να αυξάνει τη συγκέντρωση των φυτοαλεξινών, να επάγει την έκφραση των PR πρωτεϊνών και τη σύνθεση αιθυλενίου. Στον καπνό και το είδος *Arabidopsis thaliana* βρέθηκε ότι επάγεται η σύνθεση του SA (Ménard κ.ά., 2005). Στον καπνό, τα φύλλα που ψεκάστηκαν με το laminarin εμφάνισαν ανθεκτικότητα εναντίον του βακτηριακού παθογόνου *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Klarzynski κ.ά., 2000). Στον καπνό, την αραβίδωση, το ρύζι και το αμπέλι, επέμβαση με το laminarin επέφερε ενεργοποίηση των ενεργών ομάδων οξυγόνου, των κινασών και αλλαγές στο pH του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος. Στο αμπέλι και τον καπνό, το laminarin επέφερε τη συσσώρευση των φυτοαλεξινών και τη σύνθεση πρωτεϊνών παθογένεσης, αλλά δεν προκάλεσε αντίδραση υπερευαισθησίας (Ménard κ.ά., 2004). Η δραστική ουσία έχει εξασφαλίσει έγκριση χρήσης στην καλλιέργεια σιταριού για την καταπολέμηση του ωιδίου (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). Έχει διαπιστωθεί ότι επεμβάσεις (ψεκασμοί φυλλώματος) με το laminarin 48 ώρες πριν τη μόλυνση των φυτών από το παθογόνο, προκαλεί μείωση της προσβολής νεαρών φυτών σιταριού κατά 55% (Renard-Merlier κ.ά., 2007). Επίσης, οι επεμβάσεις με το laminarin μείωσαν τα επίπεδα προσβολής φυτών φράουλας από τεφρά σήψη (*Botrytis cinerea*) κατά 50-80%, εξαρτώμενα από την πίεση μόλυσματος και την ένταση προσβολής. Οι ίδιες επεμβάσεις περιόρισαν την προσβολή του ωιδίου (*Oidium* spp.) κατά 70-80% και της κηλίδωσης των φυτών φράουλας από τον μύκητα *Mycosphaerella fragariae* κατά 50% (Meszka και Beleuin, 2011). Στη χώρα μας έχει έγκριση στην καλλιέργεια μηλιάς-αχλαδιάς για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος των μηλοειδών (*Erwinia amylovora*).

1.6.4.1.3 Harpin

Το harpin που κυκλοφορεί εμπορικά με την ονομασία Messenger, είναι όξινη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το hrpN γονίδιο του βακτηρίου *Erwinia amylovora*. Η επέμβαση σε φυτά με harpin επάγει αντίδραση υπερευαισθησίας και ανθεκτικότητα και πιο συγκεκριμένα, στην αραβίδωση παρατηρείται ανθεκτικότητα στο παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και ενεργοποίηση των *PR-1* και *PR-2* πρωτεϊνών (Peng κ.ά., 2003, Dong κ.ά., 1999). Επίσης, βρέθηκε ότι η ταυτόχρονη εφαρμογή των harpin και ASM μείωσε τον δείκτη έντασης μόλυνσης (infection index) που υπέστησαν φυτά πατάτας από κομβονηματώδεις του είδους *M. chitwoodi*, σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Collins κ.ά., 2006), ενώ οι Li και Fan (1999) ανέφεραν ότι διαγονιδιακά φυτά πατάτας που εξέφραζαν την πρωτεΐνη της δραστηκής αυτής ουσίας παρουσίασαν μείωση στο ρυθμό αύξησης των κηλίδων περονοσπόρου (*Phytophthora infestans*). Επίσης, οι Qiu κ.ά. (1997) βρήκαν ότι η μεταχείριση σπόρων τομάτας με harpin αύξησε την βλάστηση και ανάπτυξη των φυτών ενώ συνετέλεσε σε αυξημένη αντοχή των φυτών στο παθογόνο αίτιο της βακτηριακής μάρανσης (*Ralstonia solanacearum*).

2. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση τριών δραστικών ουσιών (acibenzolar-S-methyl, harpin, laminarin) που προκαλούν (επάγουν) την επίκτητη διασυστηματική αντοχή των φυτών στη δυνητική μείωση τόσο των ποσοστών, όσο και της έντασης προσβολής φυτών κολοκυθιάς (*Cucurbita pepo* L.) από τον ιό του μωσαϊκού της καρπουζιάς (WMV-watermelon mosaic virus, Potyvirus). Για τη μόλυνση των φυτών-δεικτών στα οποία αξιολογήθηκε η δράση των ουσιών χρησιμοποιήθηκε ως φορέας το είδος *A. craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae). Επίσης, μετρήθηκε η παρουσία (συγκέντρωση) του ιού στους μολυσμένους φυτικούς ιστούς των φυτών-δεικτών και συσχετίστηκε με την ένταση των συμπτωμάτων που εκδήλωναν τα προσβεβλημένα φυτά. Τέλος, διερευνήθηκε η πιθανή εκδήλωση συμπτωμάτων φυτοτοξικότητας στα φυτά-δείκτες που εκτέθηκαν στις επεμβάσεις των δραστικών ουσιών, ώστε να διασφαλιστεί ότι η εφαρμογή τους είναι ασφαλής στα κολοκυνθοειδή.

2.1 ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΑΦΙΔΩΝ

Για την πραγματοποίηση του πειράματος δημιουργήθηκαν αποικίες του είδους αφίδας που χρησιμοποιήθηκε ως δυνητικός φορέας στις δοκιμές μετάδοσης. Οι αποικίες (κλωνικές) προήλθαν από ένα άτομο για την εξασφάλιση της γενετικής ομοιομορφίας και της παραπλήσιας ικανότητας μετάδοσης που είναι απαραίτητες για την εξαγωγή αδιαμφισβήτητων αποτελεσμάτων. Το είδος *Aphis craccivora* που αξιολογήθηκε στις δοκιμές μετάδοσης αναζητήθηκε στα φυτά-ξενιστές του στους καλλιεργούμενους αγρούς. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκε από καλλιέργεια μηδικής (*Medicago sativa*) που αναπτύσσονταν στο αγρόκτημα του ΤΕΙ Μεσολογγίου.

Για την παραγωγή των φυτών επί των οποίων διατηρήθηκαν οι εργαστηριακές αποικίες του είδους *A. craccivora* πραγματοποιήθηκε σπορά κουκιών. Όλα τα φυτά αναπτύχθηκαν σε εδαφικό μίγμα εδάφους:άμμου:τύρφης σε αναλογία 2:1:1. Οι εγκαταστημένες αποικίες των αφίδων εκτέθηκαν σε φωτοπερίοδο 16 ωρών και σε θερμοκρασία 18-22°C, η οποία ευνοούσε την απρόσκοπτη παρθενογενετική τους αναπαραγωγή. Καταβλήθηκε προσπάθεια να ελέγχεται η διόγκωση του πληθυσμού των αφίδων για να αποφευχθεί ο υπερπληθυσμός που οδηγεί σε παραγωγή πτερωτών ατόμων. Αυτό συμβαίνει λόγω αυξημένης μηχανικής αλληλεπίδρασης των ατόμων,

αλλά και από την υποβάθμιση του φυτού-ξενιστή, λόγω εξαιρετικά υψηλού αριθμού ατόμων που διατρέφονται σ' αυτόν. Έτσι, οι αφίδες μεταφέρονταν τακτικά σε νεαρά φυτά ώστε να διατηρούνται σε πληθυσμιακά επίπεδα που τους επέτρεπαν ικανοποιητική ανάπτυξη. Τα φυτά επί των οποίων διατηρούνταν οι αποικίες των αφίδων αναπτύσσονταν εντός εντομοστεγών κλωβών .

2.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ

Ως αρχικό μόλυσμα χρησιμοποιήθηκε απομόνωση του ιού που συλλέχθηκε από μολυσμένα φυτά που αναπτύσσονταν στην περιοχή Βασιλικών του νομού Θεσσαλονίκης. Η απομόνωση του ιού του μωσαϊκού της καρπουζιάς (WMV) προήλθε από υπαίθρια καλλιέργεια κολοκυθιάς που παρουσίαζε εκτεταμένη προσβολή με συμπτώματα που συνήθως εκδηλώνουν τα φυτά που έχουν υποστεί προσβολή από τον ιό του μωσαϊκού της καρπουζιάς. Συγκεκριμένα, τα φυτά παρουσίαζαν έντονη δεσμίωση/στένωση και παραμόρφωση του ελάσματος, καθώς και ανάπτυξη φλυκταινοειδούς μωσαϊκού. Όμως, αυτό δεν διασφάλιζε την ασφαλή χρησιμοποίηση του αρχικού μολύσματος καθώς πολύ συχνά υφίστανται μικτές μολύνσεις φυτών των καλλιεργούμενων κολοκυνθοειδών από δύο ή και περισσότερα ιολογικά παθογόνα, ιδιαίτερα σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης των καλλιεργειών.

Γι' αυτό, τα δείγματα ελέγχθηκαν με την ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA για να αποκλειστεί η τυχόν παρουσία άλλων αφιδομεταδιδόμενων ιών των κολοκυνθοειδών, των μη-έμμονων ιών μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV-cucumber mosaic virus), κίτρινο μωσαϊκό της κοινής κολοκυθιάς, δακτυλιωτή κηλίδωση της παπάγιας (PRSV-papaya ringspot virus), (ZYMV-zucchini yellow mosaic virus), κίτρινη στιγμάτωση της κολοκυθιάς (ZYFV-zucchini yellow fleck virus), αλλά και των έμμονων ιών, αφιδομεταδιδόμενου ίκτερου των κολοκυνθοειδών (CABYV-cucurbit aphid-borne yellows virus) και δυτικού κίτρινο-ιού των τεύτλων (BWYV-beet western yellows virus). Επίσης, εξετάστηκε η πιθανή ύπαρξη των μεταδιδόμενων με αλευρώδεις ιών όπως ο ψευδο-ίκτηρος των τεύτλων (BPYV, beet pseudo-yellows virus) και ο κίτρινος νανισμός με παραμόρφωση της αγγουριάς (CYSDV, cucumber yellow stunt disorder virus).

Η παραγωγή των πρώτων μολυσμένων φυτών επιτεύχθηκε με την πραγματοποίηση μηχανικών μολύνσεων σε φυτά κολοκυθιάς, υβρίδιο Jedida F1. Η

μόλυνση των νεαρών σπορόφυτων πραγματοποιήθηκε όταν αυτά βρίσκονταν στο στάδιο των κοτυληδόνων. Ποσότητα μολυσμένου φυτικού ιστού (φύλλα με έντονα συμπτώματα ιολογικής προσβολής) λειοτριβήθηκε σε γουδί με γουδοχέρι, παρουσία φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (Phosphate buffer) 0,01M, pH 7,0. Το διάλυμα παρασκευάστηκε με τη χρησιμοποίηση δύο άλλων διαλυμάτων (Α και Β). Το διάλυμα Α περιείχε 13,6gr KH_2PO_4 /lt απεσταγμένου νερού, ενώ το διάλυμα Β περιείχε 35,89gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ /lt απεσταγμένου νερού. Τα δύο διαλύματα αναμίχθηκαν σε αναλογία 4/6 για να παρασκευαστεί τελικό διάλυμα με τιμή pH 6,95, καθώς η μολυσματικότητα των περισσότερων ιών μειώνεται σε όξινο περιβάλλον, ενώ τιμές pH 7-8,5 ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των περισσοτέρων ιών για επίτευξη ικανής μολυσματικής ικανότητας.

Ακολούθως, απλώθηκε ελαφρό στρώμα από πληγωντική ουσία (ανθρακοπυρίτιο-carborundum, 600mesh) στην επιφάνεια των κοτυληδόνων χρησιμοποιώντας ένα πλαστικό δοχείο του οποίου το άνοιγμα καλύπτονταν με δικτυωτό ύφασμα (τούλι). Η εφαρμογή αυτή αποσκοπούσε στη δημιουργία πληγών στα επιδερμικά κύτταρα του φυτοδείκτη, γεγονός που επέτρεψε την είσοδο των ιοσωματίων στα επιδερμικά κύτταρα, χωρίς να προκληθεί νέκρωσή τους πριν την είσοδο του μολύσματος, γεγονός που θα οδηγούσε σε ανεπιτυχή μηχανική μετάδοση του ιού. Μια ποσότητα του ομογενοποιημένου υλικού που περιείχε τον εκχυλισμένο ιό λήφθηκε με τα δάκτυλα του χεριού και απλώθηκε απαλά στην πάνω επιφάνεια των κοτυληδόνων. Μετά από παρέλευση ενός περίπου λεπτού οι κοτυληδόνες ξεπλύθηκαν με νερό. Σε ένα γλωσσοπίεστρο το οποίο τοποθετήθηκε σε κάθε γλαστράκι, σημειώθηκε η ημερομηνία μόλυνσης και η απομόνωση του ιού. Τα φυτά ακολούθως μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στον οποίο παρέχονταν ευνοϊκές συνθήκες για την εκδήλωση των συμπτωμάτων (θερμοκρασία μεταξύ 18 και 24°C και φωτισμός μέτριας έντασης). Η έκθεση των φυτών-δεικτών σε αυτές τις συνθήκες είναι απαραίτητη γιατί ο φωτισμός υψηλής έντασης φωτισμός δυσχεραίνει τόσο τη μόλυνση όσο και την ανάπτυξη των συμπτωμάτων.

Στη συνέχεια, καθώς εξελίσσονταν η πειραματική διαδικασία, ως πηγές μολύσματος του ιού του μωσαϊκού της καρπουζιάς χρησιμοποιήθηκαν τα φυτά κολοκυθιάς στα οποία πραγματοποιούνταν επιτυχής μετάδοσή του από τα έντομα-φορείς του. Ως μόλυσμα για κάθε αφιδομετάδοση επιλέγονταν φυτά κολοκυθιάς που

είχαν νεαρά, πλήρως αναπτυγμένα φύλλα ηλικίας συνήθως δύο περίπου εβδομάδων τα οποία έφεραν εμφανή, έντονα, τυπικά συμπτώματα της προσβολής από τον ιό.

2.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ

Νεαρά φυτά κολοκυθιάς που βρίσκονταν στο στάδιο των κοτυληδόνων ψεκάστηκαν με τα σκευάσματα Bion MX (acibenzolar-S-methyl+ mefenoxam) και Messenger (harpin) σε δοσολογία 30/100lt, ενώ το σκεύασμα Vacciplant (laminarin) εφαρμόστηκε σε δόση 75ml/100lt. Μετά την παρέλευση τεσσάρων ημερών από τις επεμβάσεις των σκευασμάτων πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές μετάδοσης του ιού σε υγιή φυτά-δείκτες, κολοκύθια υβρίδιο Jedida F1 που βρίσκονταν στο στάδιο έκπτυξης του πρώτου πραγματικού φύλλου.

Επίσης, υπήρχε μια μεταχείριση κατά την οποία άτομα του είδους-φορέα εκτέλεσαν δοκιμαστικά νύγματα επί μολυσμένων φυτών κολοκυθιάς και ακολούθως εγκαταστάθηκαν επί υγιών φυτών κολοκυθιάς τα οποία δεν είχαν δεχθεί καμιά από τις επεμβάσεις των ανωτέρω σκευασμάτων. Τέλος, στο πείραμα συμπεριλήφθηκε ως μάρτυρας και μια ομάδα φυτών που δεν εκτέθηκε στην τροφική δραστηριότητα των δυνητικά ιοφόρων αφίδων (δεν υπέστη μόλυνση), αλλά ούτε και στις δραστικές ουσίες που αξιολογήθηκαν. Αντιθέτως, αναπτύχθηκε κανονικά, δεχόμενη τις ίδιες κατάλληλες καλλιεργητικές φροντίδες (άρδευση, λίπανση). Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές. Στο πρώτο πείραμα αξιολογήθηκαν 30 φυτά, με τρεις επαναλήψεις των 10 φυτών, ενώ στο δεύτερο πείραμα αξιολογήθηκαν 45 φυτά με τρεις επαναλήψεις των 15 φυτών. Συνολικά, αξιολογήθηκαν 78 φυτά για κάθε μεταχείριση στην οποία εκτέθηκαν τα φυτά-δείκτες.

Στα πειράματα που ακολούθησαν, αρχικά οι αφίδες αποσύρθηκαν από τις εργαστηριακές τους αποικίες, τοποθετήθηκαν εντός πλαστικών κουτιών σε σκιερό, δροσερό μέρος και εξαναγκάστηκαν σε νηστεία διάρκειας 1,5-2 ωρών. Η μεταχείριση αυτή εφαρμόζεται γιατί αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα καθώς και την αποτελεσματικότητα μετάδοσης των μη έμμονων ιών. Τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές μετάδοσης ήταν ενήλικα άπτερα. Ο χειρισμός των αφίδων (μεταφορά και απόθεση από το μολυσμένο στο υγιές φυτικό υλικό) πραγματοποιήθηκε με λεπτό πινέλο που υγραίνονταν κατάλληλα και τακτικά για να διευκολύνει τη διαδικασία που ακολούθηθηκε. Οι αφίδες παρενοχλούνταν με ελαφρά

πίεση του πινέλου στα νώτα τους ώστε να αποσύρουν το στίλετο που είχαν βυθισμένο στα επιδερμικά κύτταρα των φυτών. Αυτό γίνονταν γιατί αν τραυματίζονταν ή έσπαγε με βίαιη απόσπασή του θα αχρηστεύονταν η δυνατότητα μετάδοσης των ιών από τα στοματικά μέρη των αφίδων. Οι αφίδες που επιχειρούσαν να διαφύγουν ή αυτές που έπεφταν από τα φύλλα στα οποία τοποθετούνταν, μεταφέρονταν ξανά στην επιφάνεια του φυτικού υλικού, ώστε να παραμείνουν σε αυτό όσο χρονικό διάστημα είχε καθοριστεί (3-4 λεπτά) να διαρκέσει η τροφική δραστηριότητα για την πρόσληψη του ιού.

Τα φυτά κολοκυθιάς στα οποία τελικά μεταφέρονταν οι αφίδες βρίσκονταν στο στάδιο της εμφάνισης του πρώτου πραγματικού φύλλου. Σε κάθε φυτό-δείκτη μεταφέρθηκαν και εκτέλεσαν δοκιμαστικά νύγματα πέντε δυνητικά ιοφόρων ατόμων του εντόμου-φορέα, *A. craccivora*. Ακολουθώντας, το κάθε φυτό-δείκτης καλύπτονταν με εντομοστεγές υλικό ώστε να διασφαλίζεται η παραμονή των αφίδων σε αυτό και να αποφεύγεται η τυχαία διασπορά μεμονωμένων αφίδων και η πρόκληση ανεπιθύμητων επιμολύνσεων. Τα έντομα παρέμειναν επί των φυτών-δεικτών για διάστημα 6-7 ωρών και στη συνέχεια απομακρύνονταν το εντομοστεγές υλικό και ψεκάζονταν με εντομοκτόνο διάλυμα της συνθετικής πυρεθρίνης bifenthrin σε δοσολογία 0,25ml/lit.

Στη συνέχεια τα φυτά μεταφέρονταν σε εντομοστεγές θερμοκήπιο όπου παρέμεναν για διάστημα τριών εβδομάδων μέχρι την εκδήλωση ξεκάθαρων συμπτωμάτων ιολογικής μόλυνσης. Τα φυτά εντός του θερμοκηπίου δέχονταν εβδομαδιαίους ψεκασμούς με imidacloprid για την εξόντωση πτερωτών αφίδων που ενδεχομένως εισέρχονταν εντός του χώρου διατήρησής τους και μπορούσαν να προκαλέσουν επιμολύνσεις. Δείγμα φύλλου από κάθε φυτό ελέγχθηκε με την ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ποσοστά μετάδοσης του ιού του μωσαϊκού της καρπουζιάς (WMV) σε υγιή φυτά κολοκυθιάς που επιτεύχθηκαν από το είδος *A. craccivora* παρατίθενται στον πίνακα 2. Τα ποσοστά αυτά αφορούν στις τέσσερις μεταχειρίσεις (μόλυνση από ιοφόρες αφίδες που ακολούθησε τη διενέργεια επεμβάσεων των υπό αξιολόγηση δραστικών ουσιών και εκείνη στην οποία η μόλυνση πραγματοποιήθηκε με εκτέλεση αφιδομετάδοσης χωρίς την πραγματοποίηση επεμβάσεων), για τα δύο πειράματα. Επίσης, περιλαμβάνονται τα μηδενικά ποσοστά μετάδοσης της ομάδας των φυτών του μάρτυρα, τα οποία δεν εκτέθηκαν σε δυνητική μόλυνση από τα ιοφόρα άτομα της αφίδας-φορέα.

Πίνακας 2. Ποσοστά μετάδοσης του ιού του μωσαϊκού της καρπουζιάς μετά από εφαρμογή των δραστικών ουσιών acibenzolar-S-methyl, laminarin και harpin πριν την πραγματοποίηση των δοκιμών μετάδοσης από την αφίδα της μηδικής, *A. craccivora*.

Μεταχειρίσεις	Πείραμα 1	Πείραμα 2	ΣΥΝΟΛΟ
Watermelon mosaic virus (WMV)	20/30 (67%)	29/45 (64%)	49/75 (65,5%)
WMV+acibenzolar-S-methyl	18/30 (60%)	27/45 (60%)	46/75 (60%)
WMV+laminarin	18/30 (60%)	28/45 (62%)	46/75 (61%)
WMV+harpin	21/30 (70%)	30/45 (67%)	49/75 (63,5%)
Μάρτυρας	0/30 (0%)	0/45 (0%)	0/75 (0%)

Τα αποτελέσματα παρουσίασαν μεγάλη ομοιογένεια μεταξύ των δύο πειραμάτων, εξασφαλίζοντας την αναγκαία επαναληψιμότητα που επιτρέπει τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Συγκεκριμένα, όπως καταγράφεται και στον πίνακα 1, τα ποσοστά μετάδοσης για τις μεταχειρίσεις WMV, WMV+acibenzolar-S-methyl, WMV+laminarin και WMV+harpin στα δύο πειράματα ήταν 67 και 64%, 60 και 60%, 60 και 62%, 70 και 67%, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι οι συγκεκριμένες δραστικές ουσίες που αξιολογήθηκαν και οι οποίες επάγουν την διασυστηματική αντοχή των φυτών σε διάφορα παθογόνα δεν είναι αποτελεσματικές στην αποφυγή της μόλυνσης των φυτών κολοκυθιάς από το μωσαϊκό της καρπουζιάς (Watermelon mosaic virus, WMV). Αυτό τεκμαίρεται από τα παραπλήσια ποσοστά μόλυνσης των υγιών φυτοδεικτών που σημειώθηκαν μετά την πραγματοποίηση των νυγμάτων δοκιμασίας από τις ιοφόρες αφίδες στις μεταχειρίσεις των φυτών που δέχθηκαν τις επεμβάσεις των ουσιών αυτών και των φυτών που απλώς εκτέθηκαν στη μόλυνση με τις δοκιμές μετάδοσης χωρίς προηγούμενη έκθεσή τους στα acibenzolar-S-methyl, harpin και laminarin.

Αντίθετα, οι Pappu κ.ά. (2000) και Anfoca (2000) ανέφεραν σημαντική μείωση της έντασης των συμπτωμάτων αλλά και των ποσοστών μόλυνσης των ιών του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας (TSWV) και του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV) σε φυτά καπνού και τομάτας, αντίστοιχα, μετά την χρήση του acibenzolar-S-methyl. Επίσης, οι Gent κ.ά. (2004) ανέφεραν ότι η πραγματοποίηση τεσσάρων επεμβάσεων με το acibenzolar-S-methyl συνετέλεσε σε μείωση κατά 34% της προσβολής καλλιεργειών κρεμμυδιού από τον ιό της κίτρινης κηλίδωσης της ίριδας (Iris yellow spot virus, IYSV). Αυτές είναι κάποιες από τις περιπτώσεις που η χρησιμοποίηση ουσιών που επάγουν την επίκτητη διασυστηματική άμυνα των φυτών περιόρισαν τις επιπτώσεις ιολογικών παθογόνων/προσβολών στα φυτά-ξενιστές τους. Αντίθετα, υπάρχει σημαντικός αριθμός αναφορών για αξιόλογη δράση του acibenzolar-S-methyl στην μείωση της έκτασης και έντασης προσβολής σε κηπευτικά (Godard κ.ά., 1999), σιτάρι και κριθάρι (φυτά μεγάλης καλλιέργειας) (Gorlach κ.ά., 1996), καπνό (Friedrich κ.ά., 1996), ακόμα και δενδρώδεις καλλιέργειες όπως τη

ροδακινιά (Campbell και Wilson, 1999), εναντίον παθογόνων μυκήτων και βακτηρίων.

Μέρος της σημασίας που αποδίδεται στις ουσίες που αξιολογήθηκαν είναι και η εμφανής μείωση της έντασης των συμπτωμάτων που εκδηλώνουν τα προσβεβλημένα φυτά μετά από την μόλυνση των παθογόνων οργανισμών (μυκήτων, βακτηρίων, ιών). Η εκτίμηση της έντασης των συμπτωμάτων προσβολής στα φυτά που μολύνθηκαν στα δύο πειράματα πραγματοποιήθηκε μακροσκοπικά και αποδίδεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Μακροσκοπική εκτίμηση της έντασης των συμπτωμάτων προσβολής των προσβεβλημένων φυτοδεικτών, στις τέσσερις μεταχειρίσεις που αξιολογήθηκαν.

Μεταχειρίσεις	1 ^ο πείραμα	2 ^ο πείραμα	Μέσος όρος
WMV	3,0	3,0	3,0
WMV+acibenzolar-S-methyl	2,1	2,0	2,05
WMV+laminarin	2,71	2,7	2,70
WMV+harpin	2,27	2,4	2,33

Αναφορικά με την ένταση των συμπτωμάτων που αναπτύχθηκαν στα φυτά που υπέστησαν μόλυνση, αξιολογήθηκε και βαθμολογήθηκε μακροσκοπικά η ένταση κάθε φυτού που μολύνθηκε σε κάθε μία από τις μεταχειρίσεις και προέκυψε ο τελικός μέσος όρος της έντασης, διαιρώντας την συνολική τιμή με τον αριθμό των μολυσμένων φυτών που αξιολογήθηκαν (οι μεμονωμένες τιμές δεν παρουσιάζονται). Υπήρξε άριστη επαναληψιμότητα, καθώς καταγράφηκαν παραπλήσιες τιμές έντασης προσβολής για κάθε μεταχείριση και στα δύο πειράματα της μελέτης. Η εντονότερη συμπτωματολογία εκδηλώθηκε στα φυτά-δείκτες που μολύνθηκαν με τον ιό χωρίς να εκτεθούν στις επεμβάσεις των δραστικών ουσιών πρόκλησης (επαγωγής) της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής. Τα φυτά αυτά παρουσίασαν ένταση προσβολής που βαθμολογήθηκε με τη μεγαλύτερη δυνατή τιμή (3), καθώς εμφάνισαν έντονη δεσμίωση του ελάσματος και φλυκταινοειδές μωσαϊκό.

Η ένταση των συμπτωμάτων προσβολής από τον ιό του μωσαϊκού της καρπουζιάς στα φυτά κολοκυθιάς που δέχθηκαν τις επεμβάσεις της δραστικής ουσίας laminarin (σκεύασμα Vacciplant) δεν παρουσίασε ιδιαίτερα σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα φυτά που μολύνθηκαν χωρίς να εκτεθούν σε κάποια χημική επέμβαση (μέσος όρος τιμών των δύο πειραμάτων 2,7 και 3, αντίστοιχα) (Πίνακας 3). Αντίθετα, ελαφρά διαφοροποίηση καταγράφηκε στη μεταχείριση κατά την οποία τα φυτά δέχθηκαν επεμβάσεις με την δραστική ουσία harpin. Συγκεκριμένα, η μακροσκοπική εκτίμηση της έντασης των συμπτωμάτων στα φυτά που εκτέθηκαν στην ουσία harpin (σκεύασμα Messenger) παρουσίασε τιμές 2,27 και 2,4, αντίστοιχα, για τα δύο πειράματα, σε σχέση με την τιμή έντασης 3 που χαρακτήρισε τα φυτά που μολύνθηκαν μόνο από τον ιό.

Αντίθετα, αξιολογη μείωση της έντασης των συμπτωμάτων προσβολής προέκυψε κατά την μεταχείριση στην οποία τα φυτά εκτέθηκαν προηγουμένως στην ουσία acibenzolar-S-methyl (σκεύασμα Bion MX), καθώς στα δύο πειράματα η ένταση προσβολής ήταν αντίστοιχα 2,1 και 2, σε σύγκριση με την ένταση προσβολής που χαρακτήρισε τη μεταχείριση των φυτών που απλώς μολύνθηκαν από τις δοκιμές μετάδοσης των αφίδων (τιμή έντασης 3) (Πίνακας 3).

Επίσης, μετρήθηκε η συγκέντρωση του ιού στους ιστούς των προσβεβλημένων φυτών από τον ιό, με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των θετικών δειγμάτων στο φωτόμετρο ELISA και συσχετίστηκε με την ένταση των συμπτωμάτων. Όπως και στην περίπτωση της αξιολόγησης της έντασης των συμπτωμάτων αθροίστηκαν οι τιμές για κάθε μολυσμένο (θετικό) δείγμα που κατέγραφαν την οπτική πυκνότητα στο φωτόμετρο και διαιρέθηκαν με το συνολικό αριθμό των φυτών που υπέστησαν προσβολή σε κάθε μεταχείριση (οι επιμέρους τιμές επίσης δεν παρουσιάζονται). Διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση του ιού στους φυτικούς ιστούς των μολυσμένων φυτών ήταν παραπλήσια σε όλες τις μεταχειρίσεις στις οποίες εκτέθηκαν τα φυτά (με ή χωρίς την εφαρμογή των χημικών ουσιών) και στα δύο πειράματα. Απλώς, υπήρξε διαφοροποίηση στην καταγραφείσα συγκέντρωση του ιού στους μολυσμένους ιστούς των φυτών, στα δύο πειράματα (Πίνακας 4). Αυτή η παρατήρηση δικαιολογεί και την παραπλήσια συμπτωματολογική εικόνα που παρουσίαζαν τα περισσότερα μολυσμένα φυτά μεταξύ των μεταχειρίσεων που αξιολογήθηκαν. Μια ελαφρά (μη στατιστικά σημαντική) διαφοροποίηση καταγράφηκε για τις ουσίες acibenzolar-S-methyl και harpin, σε

αντιστοιχία με τις τιμές έντασης συμπτωμάτων με τις οποίες βαθμολογήθηκαν τα φυτά-δείκτες αυτών των μεταχειρίσεων (επεμβάσεων).

Πίνακας 4. Συγκέντρωση του ιού του μωσαϊκού της καρπουζιάς στους ιστούς μολυσμένων φυτών που προέκυψαν στις μεταχειρίσεις των φυτοδεικτών με και χωρίς τις επεμβάσεις με τις δραστικές ουσίες acibenzolar-S-methyl, harpin και laminarin.

Μεταχειρίσεις	1ο Πείραμα	2ο Πείραμα	Μέσος όρος
WMV	1,37	0,87	1,12
WMV+acibenzolar-S-methyl	1,33	0,80	1,06
WMV+laminarin	1,41	0,81	1,11
WMV+harpin	1,35	0,81	1,08

Οι ουσίες που αξιολογήθηκαν δεν έχουν ακόμα πάρει έγκριση χρήσης για τα κολοκυνθοειδή στη χώρα μας. Ένας από τους σκοπούς της μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν η εφαρμογή τους προκαλεί την εκδήλωση συμπτωμάτων τοξικότητας στα φυτά κολοκυθιάς, μη καθιστώντας δυνατή την χρησιμοποίηση/αξιοποίησή τους. Διαπιστώθηκε η απουσία εκδήλωσης εμφανών συμπτωμάτων (χλώρωση, νεκρωτικά συμπτώματα, ανάσχεση της ανάπτυξης των φυτών) στα φυτά κολοκυθιάς που εκτέθηκαν στις επεμβάσεις τους. Αυτή η προκαταρκτική μελέτη είναι ενθαρρυντική γιατί υποδηλώνει ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν δυνητικά με σχετική ασφάλεια για την καταπολέμηση μυκητολογικών ή βακτηριολογικών και ενδεχομένως κάποιων ιολογικών ασθενειών που προσβάλλουν τα κολοκυνθοειδή. Προφανώς, είναι αναγκαία η πραγματοποίηση και άλλων μελετών στις οποίες θα παρακολουθείται, θα αξιολογείται και θα καταγράφεται η ανταπόκριση των φυτών μετά την έκθεσή τους στις δραστικές ουσίες, σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, αλλά και καθ' όλη την διάρκεια ανάπτυξης των φυτών, ώστε να καθοριστεί αν υφίστανται τελικά επιπτώσεις στην ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών.

Οι μολύνσεις από τις δοκιμές μετάδοσης με τις αφίδες-φορείς επιτεύχθηκαν λίγες ημέρες μετά την εφαρμογή των δραστικών ουσιών που αποσκοπούσε στην απόκτηση (επαγωγή) επίκτητης διασυστηματικής αντοχής στην δυνητική μόλυνση από το παθογόνο. Προφανώς, στο συγκεκριμένο παθο-σύστημα (κολοκυθιά, ιός του μωσαϊκού της καρπουζιάς) οι ουσίες αυτές δεν παρέχουν σημαντική προστασία μειώνοντας τα ποσοστά μόλυνσης, δεν διαφοροποιούν αισθητά την ένταση των συμπτωμάτων προσβολής, ούτε επηρεάζουν ουσιαστικά την συγκέντρωση του ιού εντός των ιστών των προσβεβλημένων φυτών. Τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανωτέρω μελέτη αποτελούν μια πρώτη προσέγγιση αξιολόγησης των δυνατοτήτων των συγκεκριμένων δραστικών ουσιών στη διαχείριση των επιπτώσεων προσβολής του ιού του μωσαϊκού της καρπουζιάς στα κολοκυνθοειδή. Είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν και άλλες εργαστηριακές μελέτες καθώς και πειράματα αγρού στα οποία φυτά που αναπτύσσονται σε πραγματικές συνθήκες καλλιέργειας θα δέχονται επεμβάσεις εκτεθειμένα ταυτόχρονα στην 'απειλή' μόλυνσης από τον ιό, σε φυσικές συνθήκες. Ενδεχομένως να αποβούν αποτελεσματικές οι επαναλαμβανόμενες επεμβάσεις για την ενίσχυση της δράσης τους και την περιστολή της έντασης προσβολής, αλλά και της έντασης των εκδηλούμενων συμπτωμάτων σε όσα φυτά υφίστανται προσβολή.

Για την εξακρίβωση των ποσοστών μετάδοσης του ιού του μωσαϊκού της καρπουζιάς επιλέχθηκε ένα σημαντικό είδος-φορέα με εγνωσμένα υψηλή αποτελεσματικότητα μετάδοσης φυτικών ιών. Το είδος *Aphis craccivora* μεταδίδει σημαντικό αριθμό φυτικών ιών (περισσότερους από 30) και ταυτόχρονα εκδηλώνει έντονη πτητική δραστηριότητα σε καλλιεργούμενους και αυτοφυείς ξενιστές στη διάρκεια της άνοιξης αλλά και των θερμών καλοκαιρινών μηνών. Συνεπώς, η διαρκής παρουσία του το καθιστά σημαντικό παράγοντα διασποράς του μολύσματος του ιού του μωσαϊκού της καρπουζιάς, αλλά και των άλλων μη-έμμονων αφιδομεταδιδόμενων ιών που προσβάλλουν τα κολοκυνθοειδή στις ζώνες καλλιέργειας των κηπευτικών στη χώρα μας. Το είδος παρουσιάζει σχετική αντοχή στις ξηροθερμικές συνθήκες του καλοκαιριού, αλλά ταυτόχρονα οικοδομεί σημαντικούς πληθυσμούς σε αρδευόμενες καλλιέργειες (μηδική, φασολιές και άλλα καλλιεργούμενα και αυτοφυή ψυχανθή).

Παρά τη διαπιστωμένα μειωμένη αποτελεσματικότητα του μέτρου της διενέργειας επεμβάσεων με εντομοκτόνα/αφιδοκτόνα στην ραγδαία ανάσχεση της

διασποράς του ιικού μολύσματος και την πρόκληση επιδημιών στις καλλιέργειες, συστήνεται η εκτέλεση εντομοκτόνων επεμβάσεων για τη μείωση των πληθυσμών των αφίδων. Αυτό το μέτρο καθώς και οι επεμβάσεις με ουσίες που επάγουν την διασυστηματική αντοχή των φυτών με επαναλαμβανόμενες εφαρμογές μπορούν να αποτελέσουν συμπληρωματικές δυνατότητες μιας ολοκληρωμένης προσέγγισης για τη διαχείριση των προσβολών των κολοκυνθοειδών (και των κηπευτικών γενικότερα) από τους μη έμμονους φυτικούς ιούς. Άλλα μέτρα που αξιοποιούνται είναι η φύτευση φυτών-φρακτών, η κάλυψη του εδάφους με αντανακλαστικά υλικά που απωθούν τις πτερωτές αφίδες που επιχειρούν να ‘εισβάλλουν’ στις καλλιέργειες, η επιμελής καταπολέμηση των ζιζανίων (‘δεξαμενών’ του ιικού μολύσματος) μεταξύ και εντός των καλλιεργειών, οι επεμβάσεις με ορυκτέλαια που παρεμβαίνουν στην πρόσληψη και μετάδοση των ιοσωματίων στα στοματικά μόρια των αφίδων-φορέων. Παρόλα αυτά, η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ή ανεκτικών ποικιλιών/υβριδίων αποτελεί το οικονομικότερο και ταυτόχρονα αποτελεσματικότερο μέτρο αντιμετώπισης του προβλήματος των μη-έμμονων ιών στις καλλιέργειες κηπευτικών.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Ζιώγας, Β. και Α. Μάρκογλου. 2010. Γεωργική Φαρμακολογία, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων, Δεύτερη έκδοση, Αθήνα, 2010, σελ. 12, 230-232.
- Ηλιόπουλος Α. 2004. Γενική Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις «Έμβρυο», Αθήνα, σελ. 173-190, 196-217.
- Ηλιόπουλος Π.Α. 2009. Γενική Γεωργική Ζωολογία και Εντομολογία. Εργαστηριακές Ασκήσεις. Εκδόσεις «Έμβρυο», σελ. 120-127.
- Μωραΐτης, Η. 2011. Αξιολόγηση επιφανειοδραστικών ουσιών για την αντιμετώπιση του βακτηριακού έλκους της τομάτας, Μεταπτυχιακή μελέτη, ΓΠΑ, Αθήνα.
- Παναγόπουλος, Χ., Γ. 2000. Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών, Β' Έκδοση, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 288-291.
- Παπαβασιλείου, Χ.Γ., Χ.Ι. Δόβας, Λ.Χ. Παπαγιάννης, Α.Δ. Αυγελής, Π.Η. Κυριακοπούλου, Κ. Δούλιας και Ν. Κατής. 2002. Συχνότητα εμφάνισης εντομομεταδιδόμενων ιών σε καλλιέργειες κολοκυνθοειδών. 11^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Πρέβεζα, 1-4 Οκτωβρίου 2002, Περιλήψεις, σελ. 115-116.
- Παπαπαναγιώτου, Α.Π. και Α. Μαράντης. 2011. Νέα είδη αφίδων-φορέων του ιού του μωσαϊκού της καρπουζιάς (Watermelon mosaic virus, WMV). 14^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, Ναύπλιο, 11-14 Οκτωβρίου, σελ. 206-208.
- Παπαπαναγιώτου, Α. 2005. Σημειώσεις του μαθήματος 'Έχθροί και Ασθένειες Ανθοκηπευτικών Καλλιεργειών', ΤΕΙ Μεσολογγίου, σελ. 63-66, 205-210.

Τζάμος, Ε. 2007. Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Β' έκδοση, Αθήνα, σελ. 293-326, 381-409.

Τζανακάκης, Μ.Ε. 1980. Μαθήματα Εφαρμοσμένης Εντομολογίας. Α.Π.Θ., Έκδοση Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Θεσσαλονίκη, σελ. 212-213.

Φανουράκης, Ν. 2010. Γενετική Βελτίωση φυτών, Βασικές Αρχές, 2^η έκδοση, Εκδόσεις 'ΙΩΝ', Αθήνα, σελ. 225-234.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

Abo-Elnasr, M. A., K. A. El-DougDoug, M. H. El-Kattan and E. A. Salem, 2005. Induction of Salicylic Acid in Cucumber Against ZYMV Potyvirus by Some Chemicals. Intern. J. Virol. 1 (1), 30-30.

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology, Elsevier Academic Press, Fifth Edition, USA, 237-242, 315-316.

Anfoca, G.H. 2000. Benzo-(1, 2, 3)-thiazazole-7-carbothioicacid-S-methyl-ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Vollendung) to Cucumber mosaic virus. Crop Prot. 19, 401-405.

Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S. P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in Plant-Microbe Interactions. Sci. 276, 726-733.

Balogun, O.S., S.O. Adebayo and T.H. Aliyu. 2009. Incidence and severity of Sugarcane mosaic disease in selected varieties of sugarcane from the Unilorin sugar research institute germplasm. Proceeding of the 33th Annual Conference of Genetics Society of Nigeria, 27-30.

- Benhamou, N. and R.R. Belanger. 1998. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Plant J.* 14, 13-21.
- Burgyán, J. 2006. Virus induced RNA silencing and suppression: Defence and counter-defence, *J. Plant Path.* 88(3), 233-244.
- Campbell, H.L. and M. Wilson. 1999. Evaluation of Actigard (CGA-245704) for the control of bacterial spot of peach. *Phytopathol.* 89, 511 (Abstract).
- Chin, M., M.H. Ahmad, and P. Tennant. 2007. *Momordica charantia* is a weed host reservoir for Papaya ringspot virus type P in Jamaica. *Plant Dis.* 91: 1518.
- Chisholm, S. T., G. Coaker, B. Day and B. J. Staskawicz 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803-814.
- Cole, DL. 1999. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Prot.* 18, 267-273.
- Collins H.P., D.A. Navare, E. Riga and F.J. Pierce. 2006. Effect of foliar applied plant elicitors on microbial and nematode populations in the root zone of potato. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 37, 1747-1759.
- Conrath, U. 2006. Systemic Acquired Resistance. *Plant Signal. and Behav.* 1, 179-184.
- Dong, H., T.P. Delaney, D.W. Bauer, and S.V. Beer. 1999. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance-pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. *The Plant J.* 20, 207-215.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopath.* 9, 275-296.

- Friedrich, L., K. Lawton, S. Dincher, A. Winter, T. Staub, S. Uknes, H. Kessmann and J. Ryals. 1996. Benzothiadiazole induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10, 6170.
- Garzo, E. I., M. Duque and A. Fereres. 2004. Transmission efficiency of different non-persistent viruses infecting melon by four aphid species. *Spanish J. of Agric. Res.* 2, 369-376.
- Gent, D.H., H.F. Schwartz and R. Khosta. 2004. Distribution and incidence of Iris yellow spot virus and its relation to onion plant population and yield. *Plant Dis.* 88, 446-452.
- Gildow, F. E., D. A. Shah, W. M. Sackett, T. Butzler, B. A. Nault and S. J. Fleischer. 2008. Transmission efficiency of *Cucumber mosaic virus* by aphids associated with virus epidemics in snap bean. *Viol.* 98, 1233-1241.
- Gitlin, L. and R. Andino. 2003. Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *J. Virol.* 77, 7159-7165.
- Godard, J-F., S. Ziadi, C. Monot, D. le Corre and D. Silue'. 1999. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. *Crop Prot.* 18, 397-405.
- Gorlach, J., S. Volrath, G. Knauf-Beiter, G. Hengry, U. Beekhove, K.-H. Kogel, M. Osterdrop, T. Staud, E. Ward, H. Kessman and J. Ryals. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629.
- Hammond-Kosack, K. E. and J. D. G. Jones. 1996. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.

- Hammond-Kosack, K. and J. Jones. 1997. Plant Disease Resistance Genes, Annual Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. 48, 575-607.
- Hooks, C. R. R. and A. Fereres. 2006. Protecting crops from non-persistently aphid-transmitted viruses: a review on the use of barrier plants as a management tool. Virus Res. 120, 1-16.
- Holmes, F.O. 1929. Local lesions in tobacco mosaic. Bot. Gaz. 87, 39-70.
- Jones, J. D. G. and J. L. Dangl. 2006. The plant immune system. Nature 444, 323-329.
- Jensen, B.D., A.O. Latunde-Dada, D. Hudson and J.A. Lucas. 1998. Protection of *Brassica* seedlings against downy mildew and damping-off by seed treatment with CGA 245704, an activator of systemic acquired resistance. Pesticide Sci. 52, 63-69.
- Kalogirou, M. 2012. Antiviral and Quality Effects of Chemical Elicitors and *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) Infection on Tomato Plants and Fruits, Ph.D Thesis, Cranfield University.
- Klarzynski, O., B. Plesse, J. Y. Joubert, M. Kopp, B. Kloareg and B. Fritig. 2000. Linear β -1,3 Glucans are Elicitors of Defense Responses in Tobacco. Plant Physiol. 124(3), 1027-1038.
- Kuc, J. 1990. Immunization for the control of plant disease. *In*: Biological Control of Soil-Borne Pathogens (D. Hornby, Ed.), CAB International, Wallingford, UK, 355-373.
- Kuc, J. 1987. Plant immunization and its applicability for disease control. *In*: Innovative Approaches to Plant Disease Control (I. Chet, Ed.), John Wiley, New York, 255-274.

- Lang, J.M., D.H. Gent and H.F. Schwartz. 2007. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant Dis.* 91, 871-878.
- Lawton, K., K. Weymann, L. Friedrich, B. Vernooij, S. Uknew, and J. Ryals. 1995. Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis* requires Salicylic Acid but not Ethylene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8(6), 863-870.
- Li, R. and Y. Fan. 1999. Reduction of lesion growth rate of late blight disease in transgenic potato expressing harpin protein. *Sci. in China series.* 42(1), 96-101.
- Madrigal, A. and O. Corrales. 2000. Boost 50SC, plant activator which improves natural resistance of banana to black Sigatoga (*Mycosphaerella fijiensis*) and nematodes (*Radopholus similis*). Abstracts of Papers of the XIVth ACORBAT Meeting. San Juan, Puerto Rico, July 31 to August 4, pp. 45.
- Mandadi, K., K., Scholthof, K., B. 2013. Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *Plant Cell*, 25, 1489-1505.
- Matheron, M.E. and M. Porchas. 2000. Evaluation of fungicide performance for control of powdery mildew on lettuce in 2000. Univ. Arizona Coll. Agric. 2000, vegetable report.
- Ménard, R., P. de Ruffray, B. Fritig, J-C. Yvin and S. Kauffmann 2005. Defense and resistance-Inducing activities in tobacco of the sulfated β -1,3 glucan PS3 and its synergistic activities with the unsulfated molecule. *Plant Cell Physiol.* 46(12), 1964-1972.
- Ménard, R., S. Alban, P. de Ruffray, F. Jamois, G. Franz, B. Fritig, J.-C. Yvin and S. Kauffmann. 2004. β -1,3 Glucan sulfate, but not β -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 3020-3032.

- Meszka, B. and A. Beleuin. 2011. Activity of laminarin in control of strawberry diseases. *Phytopath.* 62, 15-23.
- Mondal, A.H., Nehl, D.B. and S.J. Allen. 2005. Acibenzolar-S-methyl induces systemic resistance in cotton against black root caused by *Thielaviopsis basicola*. *Australasian Plant Path.* 34, 499-507.
- Moran, P. J. and G. A. Thompson 2001. Molecular Responses to Aphid Feedings in *Arabidopsis* in Relation to Plant Defense Pathways. *Plant Physiol.* 125 (2), 1074-1085.
- Muthamilarasan, M. and M. Prasad. 2013. Plant innate immunity: an updated insight into the defense mechanism. *J. Biosci.* 38, 433-449.
- Narusaka, Y., M. Narusaka, T. Horio and H. Ishii. 1999. Comparison of Local and Systemic Induction of Acquired Disease Resistance in Cucumber Plants Treated with Benzothiadiazoles or Salicylic Acid. *Plant Cell Physiol.* 40(4), 388-395.
- Pappu, H.R., A.S. Csinos, R.M. McPherson, D.C. Jones and M.G. Stephenson. 2000. Effect of acibenzolar-S-methyl and imidacloprid on suppression of tomato spotted wilt Tospovirus in flue-cured tobacco. *Crop Prot.* 9, 349-354.
- Penazzio, S. and P. Roggero. 1998. Systemic Acquired Resistance Against Plant Virus Infections: a Reality? *J. Plant Path.* 80(3), 179-186.
- Peng, J.-L., H.-S. Dong, H.-P. Dong, T.P. Delaney, J.M. Bonasera and S.V. Beer. 2003. Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the *NDR1* and *EDS1* genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 317-326.
- Perring, T.M., C.A. Farrar, K. Mayberry and M.J. Blua. 1992. Research reveals pattern of cucurbit virus spread. *California Agric.* 3-4: 35-40.

- Qiu, D., Z.-M. Wei, D.W. Bauer and S.V. Beer. 1997. Treatment of tomato seed with harpin enhances germination and growth and induces resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Phytopath.* 87, 580.
- Renard-Merlier, D., B. Randoux, E. Novac, F. Farcy, R. Durant and P. Reignault. 2007. Iodus 40, salicylic acid, heptanol salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochem.* 68, 1156-1164.
- Ross, AF. 1961a. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* 14: 329-339.
- Ross, AF. 1961b. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 340-358.
- Ryals, J., Uknes, S., Ward, E. 1994. Systemic Acquired Resistance, Update on Plant-Microbe Interactions. *Plant Physiol.* 104, 1109-1112.
- Ryals, J. A., U. H. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H-Y. Steiner and M. D. Hunt. 1996. Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Saranya, S., R. Ushakumari, S. Jacob and B. M. Philip. 2010. Efficacy of different entomopathogenic fungi against cowpea aphid, *Aphis craccivora* (Koch). *J. of Biopest.* 3 (1 special issue), 138-142.
- Soosaar, J. L. M., T. M. Burch-Smith and S. P. Dinesh-Kumar. 2005. Mechanisms of Plant Resistance to Viruses. *Nature Reviews, Microbiology*, Nature Publishing Group 3, 789-798.
- Stackman E.C. 1915. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agric. Res.* IV, 193-201.

- Stadnik, M.J. and H. Buchenauer. 1999. Control of wheat diseases by benzothiadiazole derivative and modern fungicides. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 106, 466-475.
- Taiwo, M. A. and O. J. Akinjogunla. 2006. Cowpea viruses: Quantitative and qualitative effects of single and mixed viral infections. *African J. of Biotech.* 5, 1749-1756.
- van Loon, L. C. and E. A. van Strien. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Mini Review, *Physiol. Mol. Plant Path.* 55, 85-97.
- Vera, J., J. Castro, A. Gonzalez and A. Moenne. 2011. Seaweed Polysaccharides and Derived Oligosaccharides Stimulate Defense Responses and Protection Against Pathogens in Plants. *Marine Drugs* 9, 2514-2525.
- von Rad U., M. J. Mueller and J. Durner. 2005. Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology. *New Phytol.* 105(1), 191-202.
- Zhu, Y.J., X.H. Qiu, P.H. Moore, W.Borth, J. Hu, S. Ferreira and H.H. Albert, 2003. Systemic acquired resistance Induced by BTH in papaya. *Physiol. Mol. Plant Path.* 63, 237-248.

http://www.agroatlas.ru/en/content/pests/Aphis_craccivora/