

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ



Αικατερίνη Κασσαβέτη

«Γενετικός χαρακτηρισμός των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" της τομάτας στην Ελλάδα»

Νέα Ιωνία Μαγνησίας 2007

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Σπουδών
Κατεύθυνσης "Σύγχρονη Φυτοπροστασία"

Αικατερίνη Κασσαβέτη

**«Γενετικός χαρακτηρισμός των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την
ασθένεια "stolbur" της τομάτας στην Ελλάδα»**

Εξεταστική Επιτροπή

Ε. Βέλλιος
Λέκτορας
Επιβλέπων

Α. Παπάς
Καθηγητής
Μέλος

Ν. Παπαδόπουλος
Επικ. Καθηγητής
Μέλος

Νέα Ιωνία Μαγνησίας 2007

*Αφιερώνεται στην οικογένεια μου
για την πολύτιμη βοήθεια, συμπαράσταση, και
κατανόηση τους καθ' όλη τη διάρκεια της
μεταπτυχιακής μου διατριβής*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ Α': ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. ΤΑ ΦΥΤΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΩΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ.....	13
1.1. Περιγραφή των φυτοπλάσμάτων	13
1.2. Τα φυτοπλάσματα ως επιβλαβή φυτοπαθογόνα	13
1.3. Επιθυμητές προσβολές από φυτοπλάσματα.....	15
1.4. Τρόποι μετάδοσης των φυτοπλάσμάτων	15
1.4.1. Μετάδοση με έντομα	15
1.4.2. Μετάδοση με εμβολιασμό.....	17
1.4.3. Μετάδοση με το σπερματοφύτο παράσιτο κουσκούτα (<i>Cuscuta</i> spp.)	17
1.5. Τρόποι αντιμετώπισης των φυτοπλάσμάτων	17
1.6. Γενετυπική δομή των φυτοπλάσμάτων.....	19
1.7. Ταξινομική κατάταξη των φυτοπλάσμάτων	20
1.8. Μέθοδοι ανίχνευσης των φυτοπλάσμάτων	22
1.8.1. Μικροσκοπικές τεχνικές	22
1.8.2. Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA (Enzyme – linked immunosorbent assay, ELISA)	24
1.8.3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης	24
1.8.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction).....	24
1.8.3.2. Εστιασμένη PCR ("nested PCR")	25
1.8.3.3. Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους κλασμάτων περιορισμού DNA (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism).....	25
1.8.4. Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης φυτοπλάσμάτων.....	27
2. Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ "STOLBUR" ΣΤΗΝ ΤΟΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΕ ΑΛΛΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΦΥΤΑ	27
2.1. Γενικά.....	27
2.2. Κατάταξη των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" σε καλλιεργούμενα φυτά.....	28
2.3. Εύρος ξενιστών των φυτοπλάσμάτων της ομάδας XII (Stolbur group)	31
2.4. Συμπτώματα της ασθένειας "stolbur"	31
2.5. Έντομα - φορείς των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" σε καλλιεργούμενα φυτά.....	33
2.6. Σκοπός της εργασίας	34

ΜΕΡΟΣ Β': ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	37
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
3.1. Συλλογή φυτών τομάτας προσβεβλημένων από φυτοπλάσματα	40
3.1.1. Συλλογή των δειγμάτων	40
3.2.2. Μέτρηση συχνότητας ασθένειας στον αγρό	41
3.3. Συλλογή και εκτροφή ημίπτερων εντόμων πιθανών φορέων φυτοπλάσμάτων	41
3.3.1. Συλλογή εντόμων στον αγρό.....	41
3.3.2. Εκτροφή ημίπτερων εντόμων σε θρεπτικό διάλυμα	46
3.4. Μοριακές τεχνικές	49
3.4.1. Απομόνωση ολικού DNA από φυτά τομάτας προσβεβλημένα με φυτοπλάσματα	49

3.4.2. Αύξηση της συγκέντρωσης των φυτοπλάσμάτων από ιστούς προσβεβλημένων φυτών τομάτας	50
3.4.3. Απομόνωση ολικού DNA από ημίπτερα έντομα	51
3.4.4. Δοκιμές απομόνωσης DNA από θρεπτικό διάλυμα.....	52
3.4.5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	54
3.4.6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης.....	54
3.5. Βιοπληροφορική	55
3.6. Δοκιμές παρασιτισμού φυτών από κουσκούτα.....	55
3.6.1. Βλάστηση σπόρων κουσκούτας.....	55
3.6.2. Δοκιμές παρασιτισμού της κουσκούτας σε υγιή φυτά τομάτας και βίνκας.....	56
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	62
4.1. Συλλογή φυτών τομάτας προσβεβλημένων από φυτοπλάσματα	62
4.1.1. Μέτρηση της συχνότητας της ασθένειας στον αγρό.....	62
4.2. Συλλογή και εκτροφή ημίπτερων εντόμων πιθανών φορέων φυτοπλάσμάτων.....	62
4.2.1. Συλλογή ημίπτερων εντόμων στον αγρό.....	62
4.2.2. Ομαδοποίηση ημίπτερων εντόμων.....	63
4.3. Μοριακές τεχνικές	63
4.3.1. Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών P1/P7 ή fStol/rStol από προσβεβλημένα φυτά τομάτας με φυτοπλάσματα	63
4.3.2. Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών P1/P7 σε ημίπτερα έντομα.....	72
4.3.3. Αξιολόγηση δοκιμών απομόνωσης DNA από το θρεπτικό διάλυμα.....	72
4.4. Βιοπληροφορική	73
4.5. Δοκιμές παρασιτισμού φυτών από κουσκούτα.....	76
4.5.1. Βλαστικότητα και μήκος βλαστιδίου σπόρων κουσκούτας.....	76
4.5.2. Πειράματα παρασιτισμού της κουσκούτας σε υγιή φυτά τομάτας και βίνκας	76
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	78
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84
6.1. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	84
6.2. Ελληνική Βιβλιογραφία	93

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1	Ζεύγη γενικευμένων εκκινήτων για την ανίχνευση φυτοπλάσμάτων και εξειδικευμένων εκκινήτων για την ανίχνευση φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" (προσαρμογή από Lee <i>et al.</i> , 2001; Maixner <i>et al.</i> , 1995; Marzachi <i>et al.</i> , 2000)	Σελ. 26
Πίνακας 2	Ταξινομική κατάταξη των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" σε καλλιεργούμενα φυτά (στην τομάτα και σε άλλους ξενιστές)	Σελ. 29
Πίνακας 3	Διάφορα στελέχη και μέγεθος γενώματος (kbp) φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" σε διάφορα φυτά – ξενιστές (προσαρμογή από Marccone <i>et al.</i> , 1999)	Σελ. 30
Πίνακας 4	Έντομα – φορείς φυτοπλάσμάτων της ομάδας "stolbur" (16S rXII)	Σελ. 35
Πίνακας 5	Δειγματοληψίες που διενεργήθηκαν κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2005 και 2006	Σελ. 44
Πίνακας 6	Ημερομηνία, περιοχή και αγροί στους οποίους πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες εντόμων	Σελ. 45
Πίνακας 7	Αριθμός φυτών και βλαστιδίων κουσκούτας που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε συλλογή στα πειράματα παρασιτισμού υγιών φυτών τομάτας και βίνκας από κουσκούτα	Σελ. 60
Πίνακας 8	Δειγματοληψίες για τη συλλογή ημίπτερων εντόμων, και ομαδοποίηση των εντόμων ανά δειγματοληψία που χρησιμοποιήθηκαν για PCR	Σελ. 64
Πίνακας 9	Δείγματα ασθενών φυτών τομάτας με συμπτώματα φυτοπλασματώσεως στα οποία διαπιστώθηκε η παρουσία / απουσία φυτοπλάσμάτων	Σελ. 71

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1	Ταξινομική κατάταξη των μελών της κλάσης <i>Mollicutes</i> (προσαρμογή από Razin <i>et al.</i> , 1998)	Σελ. 21
Εικόνα 2	Φυτό τομάτας με έντονη βλαστομανία βραχέων και παχέων βλαστών και υπερμεγέθη σέπαλα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας "stolbur" (προσφορά Ε. Βέλλιου και Φ. Λιολιοπούλου)	Σελ. 42
Εικόνα 3	Σχηματισμός μεγάλων ανθοφόρων κωνοειδών οφθαλμών τομάτας που οφείλεται σε προσβολή από φυτοπλάσματα που προκαλούν την ασθένεια γιγαντοφθαλμία (προσφορά Ε. Βέλλιου και Φ. Λιολιοπούλου)	Σελ. 42
Εικόνα 4	Συστροφή και ιώδης μεσονεύριος μεταχρωματισμός φύλλων τομάτας (προσφορά Ε. Βέλλιου και Φ. Λιολιοπούλου)	Σελ. 43
Εικόνα 5	Αναροφητήρας που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή και μεταφορά των εντόμων στο εργαστήριο	Σελ. 47
Εικόνα 6	Σωλήνας Erpendorf [®] κατάλληλα διαμορφωμένος σε μικροκλωβό διατροφής	Σελ. 47
Εικόνα 7	Χάρτινο κουτί στο οποίο τοποθετούνταν μικροκλωβοί με ημίπτερα έντομα σε οριζόντια θέση προς το φως	Σελ. 48
Εικόνα 8	Σπόροι κουσκούτας πριν και μετά την απομάκρυνση του σκληρού περιβλήματος με τη χρήση θειικού οξέος	Σελ. 58
Εικόνα 9	Βλάστηση σπόρων κουσκούτας σε πλαστικό τριβλίο Petri με βρεγμένο διηθητικό χαρτί, και έκπτυξη του βλαστιδίου κουσκούτας	Σελ. 59
Εικόνα 10	Φυτά τομάτας (στο στάδιο των 5 πραγματικών φύλλων), στα οποία έχουν τοποθετηθεί βλαστίδια κουσκούτας. Τα φυτά κλείστηκαν με πλαστικές σακούλες που είχαν διαβρεχτεί ώστε να δημιουργηθεί κορεσμένη ατμόσφαιρα	Σελ. 61
Εικόνα 11	Αρσενικά και θηλυκά άτομα της ομάδας Α (Οικογένεια: Cicadellidae)	Σελ. 65
Εικόνα 12	Θηλυκά άτομα της ομάδας Β (Οικογένεια: Cicadellidae)	Σελ. 65
Εικόνα 13	Αρσενικά και θηλυκά άτομα της ομάδας Γ (Οικογένεια: Cicadellidae)	Σελ. 66
Εικόνα 14	Αρσενικά και θηλυκά άτομα της ομάδας Δ (Οικογένεια: Cicadellidae)	Σελ. 66
Εικόνα 15	Αρσενικά και θηλυκά άτομα της ομάδας Ε (Οικογένεια: Cicadellidae)	Σελ. 67
Εικόνα 16	Διαχωρισμός ενισχυμένων τμημάτων DNA μετά από PCR με χρήση των γενικευμένων εκκινητών P1/P7 σε δείγματα προσβεβλημένων φυτών τομάτας με την τεχνική της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Σειρά προϊόντων	Σελ. 69

	της PCR στην πηκτή αγαρόζης 1: θετικός μάρτυρας, 2: Ladder 1 kb, 3: κενή θέση, 4: αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA, 5: αρνητικός μάρτυρας από υγιές φυτό, 6: κενή θέση, 7: LXIII-8388, 8: XIX-5907, 9: XII-5599, 10: XXII-6132, 11: XLII-7455, 12: κενή θέση (αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR: 1800 bp)	
Εικόνα 17	Διαχωρισμός ενισχυμένων τμημάτων DNA μετά από PCR με χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών fStol/rStol σε δείγματα προσβεβλημένων φυτών τομάτας με την τεχνική της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Σειρά προϊόντων της PCR στην πηκτή αγαρόζης 1: θετικός μάρτυρας, 2: Ladder 1 kb, 3: αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA, 4: αρνητικός μάρτυρας από υγιές φυτό, 5: κενή θέση, 6: XLII-7455 7: XLII-7425, 8: XLII-7417, 9: XXI-5984, 10: X-5712, 11: XXII-6132, 12: κενή θέση (αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR: 570 bp)	Σελ. 70
Εικόνα 18	Διαχωρισμός ενισχυμένων τμημάτων DNA μετά PCR με χρήση των γενικευμένων εκκινητών P1/P7 σε δείγματα ημίπτερων εντόμων με την τεχνική της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Σειρά προϊόντων της PCR στην πηκτή αγαρόζης 1: θετικός μάρτυρας, 2: Ladder 1 kb, 3: κενή θέση, 4: αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA, 5: αρνητικός μάρτυρας από υγιές φυτό, 6: κενή θέση, 7-11: δείγματα, 12: κενή θέση (αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR: 1800 bp)	Σελ. 74
Εικόνα 19	Διαγραμματική απεικόνιση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA, της περιοχής ITS 16/23S rDNA, και τμήματος του γονιδίου 23S rDNA του φυτοπλάσματος που προκαλεί την ασθένεια "stolbur", καθώς και των περιοχών όπου υβριδίζουν ζεύγη εκκινητών με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων EMBL, καθώς και του πακέτου δεδομένων SDSC Biology Workbench (με ίδιο χρώμα φαίνονται τα ζεύγη των εκκινητών). Στην επάνω σειρά αναγράφεται η θέση όπου υβριδίζει το 3' άκρο του κάθε εκκινητή (προσαρμογή από Smart <i>et al.</i> , 1996)	Σελ. 75
Εικόνα 20	Βλαστίδια σπόρων κουσκούτας μήκους (α) 0,5 cm και (β) 4,0 cm	Σελ. 77

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

bp	base pairs
C	Κυτοσίνη
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide
ELISA	Enzyme – linked immunosorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EtOH	Αιθυλική αλκοόλη
FITC	fluorescein isothiocyanate
G	Γουανίνη
ITS	Internal Transcribe Spacer
kbp	kilobase pairs
MLOs	Mycoplasma – Like Organisms
PCR	Polymerase Chain Reaction
rDNA	ribosomal DNA
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphism
sdiH₂O	Αποστειρωμένο απιονισμένο νερό
SDSC	San Diego Supercomputer Center

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, και μέρος των αποτελεσμάτων παρουσιάστηκαν στο 13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο που έγινε τον Οκτώβριο του 2006 στην Αθήνα με τίτλο «Ανίχνευση και χαρακτηρισμός του φυτοπλάσματος που προκαλεί την ασθένεια "stolbur" της τομάτας στην Ελλάδα».

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Α. Παππά, Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, που δέχθηκε να εκπονήσω τη διατριβή μου στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, για την πολύπλευρη υποστήριξη και καθοδήγηση του, για το χρόνο που αφιέρωσε για την ανάγνωση της εργασίας μου, και για τις πολύτιμες και ουσιαστικές διορθώσεις του ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω τις πιο θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον Επιβλέποντα κ. Ε. Βέλλιο, Λέκτορα, για την εμπιστοσύνη του στην ανάθεση του θέματος, τη βοήθεια στον σχεδιασμό και την εκτέλεση του πειραματικού μέρους, τη συλλογή και διάθεση δειγμάτων ασθενών φυτών τομάτας και εντόμων, καθώς και για τη διαρκή στήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Οι επικοινωνητικές παρατηρήσεις, διορθώσεις και επισημάνσεις του συντέλεσαν σημαντικά στη βελτίωση της μορφής της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ, την κ. Φ. Λιολιοπούλου για την σημαντική βοήθεια της στο πειραματικό μέρος, τη συλλογή και διάθεση δειγμάτων ασθενών φυτών τομάτας και εντόμων, καθώς και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και διορθώσεις της.

Ακόμη, θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ν. Παπαδόπουλο τόσο για την σημαντική βοήθεια του στον προσδιορισμό της οικογένειας των ημίπτερων εντόμων, όσο και για τις χρήσιμες διορθώσεις και παρατηρήσεις του ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

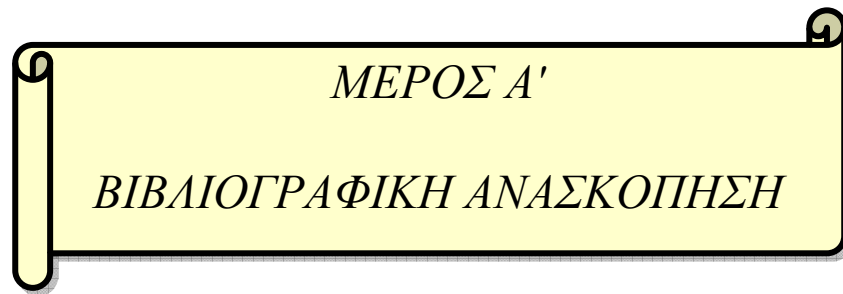
Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου και όλους όσους μου συμπαραστάθηκαν κατά την διάρκεια αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διαπίστωση της παρουσίας φυτοπλασμάτων και ο καθορισμός της ταξινομικής ομάδας στην οποία ανήκουν τα φυτοπλάσματα που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" στην τομάτα, με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών. Για το σκοπό αυτό ελήφθησαν δείγματα φυτών βιομηχανικής και επιτραπέζιας τομάτας από διάφορες περιοχές της Ελλάδας κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2005-2006. Τα συλλεχθέντα δείγματα παρουσίαζαν τυπικά συμπτώματα της ασθένειας "stolbur" ή της ασθένειας γιγαντοφθαλμία, ή και συμπτώματα που δεν κατατάσσονται στις προηγούμενες κατηγορίες. Προκειμένου να αξιολογηθεί η ένταση της προσβολής στον αγρό μετρήθηκε η συχνότητα των ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπλάσματα, η οποία άγγιξε το 12,5% και 50-60% σε αγρούς στον Παλαμά και στις Καρυές Φθιώτιδας, αντίστοιχα. Επίσης, με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και με χρήση των γενικευμένων εκκινητών P1/P7 διαπιστώθηκε η παρουσία φυτοπλασμάτων στο 90,3% των δειγμάτων ασθενών φυτών τομάτας που εξετάστηκαν. Σε όσα δείγματα έδωσαν θετική αντίδραση PCR P1/P7 έγινε εκ νέου PCR με χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών fStol/rStol όπου επιβεβαιώθηκε ότι τα φυτοπλάσματα ανήκουν στην ομάδα XII (Stolbur group).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε επίσης με μοριακές τεχνικές η παρουσία φυτοπλασματικού DNA σε ημίπτερα έντομα. Τα ημίπτερα έντομα συλλέχθηκαν κατά την καλλιεργητική περίοδο 2006 από αγρούς στο Ριζόμυλο Μαγνησίας και στις Καρυές Φθιώτιδας με φυτά τομάτας με συμπτώματα προσβολής από φυτοπλάσματα. Στη συνέχεια, διατράφηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα (διάλυμα 5% σακχαρόζης σε TE), και εξετάστηκε τόσο το θρεπτικό διάλυμα όσο και τα ίδια τα έντομα για την παρουσία φυτοπλασμάτων με PCR. Έπειτα, από χρήση των γενικευμένων εκκινητών P1/P7 δεν βρέθηκε φυτοπλασματικό DNA στα έντομα. Επίσης, σε δοκιμές απομόνωσης φυτοπλασματικού DNA από το θρεπτικό διάλυμα που είχαν διατραφεί τα έντομα δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι, αλλά η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε ήταν ελάχιστη και δεν επαρκούσε για την εφαρμογή της PCR.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παρασιτισμού κουσκούτας σε υγιή φυτά τομάτας (*Lycopersicon esculentum* Mill.) και βίνκας (*Vinca rosea* nana). Το ποσοστό βλαστικότητας των σπόρων κουσκούτας ήταν 70-100%, και το μήκος του βλαστιδίου έφτασε τα 0,5 έως 4,0 cm. Τα βλαστίδια κουσκούτας τοποθετήθηκαν στο βλαστό των φυτών και στο έδαφος σε μικρή απόσταση από το βλαστό των φυτών, αλλά δεν κατέστη δυνατό να προσκολληθούν στα υγιή φυτά.



ΜΕΡΟΣ Α'
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. ΤΑ ΦΥΤΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΩΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ

1.1. Περιγραφή των φυτοπλάσμάτων

Το 1967 Ιάπωνες επιστήμονες με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου υποστήριξαν ότι τα φυτοπλάσματα ήταν η πιθανή αιτία πρόκλησης ίκτερου στα φυτά. Πριν από την ανακάλυψη αυτή, όλες οι ασθένειες που προκαλούσαν ίκτερο στα φυτά είχαν αποδοθεί σε ιούς, παρόλο που δεν είχε αποδειχθεί αυτή η άποψη (Lee *et al.*, 2000). Σήμερα, τα φυτοπλάσματα θεωρούνται υπεύθυνα για την πρόκληση ασθενειών σε περισσότερα από 300 φυτικά είδη (Boné and Garnier, 1998; Musseti and Favali, 2004).

Τα φυτοπλάσματα είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί που ανήκουν στην κλάση *Mollicutes* (στα Λατινικά *mollis*: εύκαμπτος, *cutis*: δέρμα), έχουν διάμετρο 200 – 800 μm, καθώς ακόμη δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα, γι' αυτό και εμφανίζουν έντονο πολυμορφισμό (Lee *et al.*, 2000; Musseti and Favali, 2004; Razin *et al.*, 1998). Κάθε κύτταρο περιβάλλεται από μια κυτοπλασματική μεμβράνη τριών στρωμάτων πάχους 8-10 nm (Lee *et al.*, 2000). Το μέγεθος του γενόματος είναι μικρό (530-2200 kilobase pairs), καθώς και η περιεκτικότητα σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) είναι επίσης μικρή (Christensen *et al.*, 2005; Kamoun and Hogenhout, 2001). Επιπλέον, η παρουσία τους περιορίζεται στα αγγεία του ηθμού των προσβεβλημένων φυτών (Lee *et al.*, 2000).

Το 1994 στο 10^ο Διεθνές Συνέδριο του Διεθνούς Οργανισμού Μυκοπλασματολογίας ο όρος "φυτοπλάσματα" αντικατέστησε τον όρο MLOs (οργανισμοί που μοιάζουν με μυκοπλάσματα) από τα αρχικά του αγγλικού όρου mycoplasma – like organisms (Lee *et al.*, 2001).

1.2. Τα φυτοπλάσματα ως επιβλαβή φυτοπαθογόνα

Η παρουσία φυτοπλάσμάτων έχει αναφερθεί σε περισσότερα από 300 είδη φυτών, που ανήκουν στα γυμνόσπερμα, στα μονοκοτυλήδονα και στα δικοτυλήδονα, ενώ

ορισμένα από αυτά έχουν μεγάλο εύρος ξενιστών (Boné and Garnier, 1998; Christensen *et al.*, 2005). Στη φύση το εύρος των φυτών – ξενιστών κάθε φυτοπλάσματος καθορίζεται από τον αριθμό και τη διατροφική συμπεριφορά (μονοφάγα, ολιγοφάγα, πολυφάγα) των εντόμων – φορέων που μπορούν να μεταδώσουν το φυτόπλασμα, την ευαισθησία των φυτών στις προσβολές από φυτοπλάσματα, καθώς και την ικανότητα πολλαπλασιασμού των φυτοπλασμάτων εντός των αγγείων του ηθμού των φυτών (Garnier *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2000). Έτσι, υπάρχουν φυτοπλάσματα που μεταδίδονται από πολυφάγα έντομα και έχουν έναν ευρύ κύκλο φυτών – ξενιστών, και φυτοπλάσματα που μεταδίδονται από μονοφάγα ή ολιγοφάγα έντομα και έχουν ένα περιορισμένο εύρος φυτών – ξενιστών (Lee *et al.*, 1998a). Επίσης, μεταξύ των φυτοπλασμάτων που υπάρχουν στο ίδιο φυτό – ξενιστή ή έντομο - φορέα, είναι πιθανόν να υπάρξει αλληλεπίδραση και ανταλλαγή γενετικού υλικού, με αποτέλεσμα να προκύπτουν νέα στελέχη των φυτοπλασμάτων (Christensen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2000).

Έχει βρεθεί ότι η παρουσία των φυτοπλασμάτων περιορίζεται στα αγγεία του ηθμού (Garnier *et al.*, 2001). Αν και έχουν καταγραφεί προσβολές των ανθέων από φυτοπλάσματα, δεν θεωρείται πιθανή η μεταφορά των φυτοπλασμάτων από τα αγγεία του ηθμού στον σπόρο, μιας και δεν είναι δυνατή η απευθείας αγγειακή σύνδεση του ηθμού με το αναπτυσσόμενο έμβρυο (Christensen *et al.*, 2005). Επίσης, είναι πιθανόν τα φυτοπλάσματα να προκαλούν διατάραξη των επιπέδων των φυτοορμονών ή ρυθμιστών ανάπτυξης, αν και μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι ισχύει κάτι τέτοιο (Lee *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2003).

Τα συμπτώματα των προσβεβλημένων φυτών από φυτοπλάσματα, είναι: χλώρωση ή ερυθρίαση του φυλλώματος, πρασίνισμα ή χλωρανθία, μικροφυλλία, φυλλωδία, στείρωση ανθέων, σκούπα της μάγισσας, υπερβολική βλαστομανία, βραχυγονάτωση,

μικροκαρπία, μείωση της παραγωγής ή ακόμη και νέκρωση των προσβεβλημένων φυτών (Garnier *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000).

1.3. Επιθυμητές προσβολές από φυτοπλάσματα

Οι προσβολές από φυτοπλάσματα είναι επιθυμητές στην περίπτωση των ανθοκομικών φυτών του γένους *Euphorbia*. Έτσι, η θαμνώδης και η νάνα μορφή που παρατηρείται σε αυτά τα φυτά οφείλονται στην προσβολή από φυτόπλασμα, με αποτέλεσμα τα χαρακτηριστικά που προσδίδονται στα μολυσμένα φυτά να είναι καλαίσθητα (Lee *et al.*, 2000).

1.4. Τρόποι μετάδοσης των φυτοπλάσμάτων

Οι κύριοι τρόποι μετάδοσης των φυτοπλάσμάτων είναι με έντομα – φορείς (Οικογένειες: Cicadellidae, Fulgoridae, Psyllidae), με εμβολιασμό, και με το σπερματοφύτο παράσιτο κουσκούτα *Cuscuta* spp. (Boné and Garnier, 1998; Lee *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν έχει αποδειχθεί ερευνητικά η μετάδοση των φυτοπλάσμάτων μηχανικά, μέσω της επαφής των υγιών φυτών με το φυτικό χυμό των ήδη προσβεβλημένων φυτών και το σπόρο (Lee *et al.*, 2000).

1.4.1. Μετάδοση με έντομα

Ο κύριος τρόπος μετάδοσης των φυτοπλάσμάτων είναι με έντομα που διαθέτουν στοματικά μόρια νύσσοντος-μυζητικού τύπου των οικογενειών Cicadellidae, Fulgoridae, και Psyllidae. Τα έντομα των παραπάνω οικογενειών τρέφονται βυθίζοντας τα στοματικά τους μόρια στα αγγεία του ηθμού των φυτών – ξενιστών (Christensen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2000).

Οι φορείς εισάγουν στα αγγεία του ηθμού των ασθενών φυτών το ρύγχος, και κατά τη διατροφή τους παραλαμβάνουν τα φυτοπλάσματα μαζί με τον φυτικό χυμό. Τα

φυτοπλάσματα αρχικά πολλαπλασιάζονται στο πεπτικό σύστημα (μεσέντερο) του εντόμου, και στη συνέχεια, μέσω της αιμολέμφου, μεταφέρονται σε διάφορα όργανα του φορέα, συμπεριλαμβανομένων των σιελογόνων αδένων. Όταν τελικά τα φυτοπλάσματα εγκατασταθούν στους σιελογόνους αδένες, τότε μεταδίδονται με το σάλιο των εντόμων (Christensen *et al.*, 2005; Garnier *et al.*, 2001).

Προϋπόθεση για την μετάδοση των φυτοπλάσμάτων από τους φορείς τους είναι η υψηλή συγκέντρωση των φυτοπλάσμάτων στους σιελογόνους αδένες, ώστε μέσω των νυγμάτων διατροφής, να είναι δυνατή η μόλυνση των υγιών φυτών (Christensen *et al.*, 2005). Υπάρχει μια ελάχιστη περίοδος διατροφής των εντομών στα ασθενή φυτά (περίοδος διατροφής - προσλήψεως) προκειμένου οι φορείς να παραλάβουν τα φυτοπλάσματα. Για παράδειγμα το έντομο *Cacopsylla pruni* πρέπει να διατραφεί 2-4 ημέρες ώστε να καταστεί ικανό για να μεταφέρει την ασθένεια "European stone fruit yellows" (Carraro *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 2005). Επιπλέον, ο χρόνος μεταφοράς των φυτοπλάσμάτων στους σιελογόνους αδένες διαφέρει για κάθε έντομο φορέα από 2-7 ημέρες για το *Hyalosthes obsoletus* έως και 1-2 μήνες για το *Amphiprion bicinctus* (EPPO/CABI, 2006). Η περίοδος αυτή είναι γνωστή ως "λανθάνουσα περίοδος" και διαφέρει μεταξύ των εντόμων – φορέων (Christensen *et al.*, 2005). Ακόμη, έχει βρεθεί ότι χρειάζεται ένας ελάχιστος χρόνος διατροφής (περίοδος εμβολιασμού) των εντόμων – φορέων στα υγιή φυτά ώστε να τα μολύνουν, όπως για παράδειγμα 1-2 ημέρες για την ψύλλα *Cacopsylla pruni* (Carraro *et al.*, 2001).

Μετά την πρόσληψη των φυτοπλάσμάτων, οι φορείς διατηρούν την ικανότητα μετάδοσης των φυτοπλάσμάτων για την υπόλοιπη διάρκεια ζωής τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ικανότητα αυτή διατηρείται ακόμη και σε περιόδους μειωμένης δραστηριότητας, όπως για παράδειγμα κατά την διαχείμαση (Christensen *et al.*, 2005). Επίσης, δεν θεωρείται δυνατή η μετάδοση των φυτοπλάσμάτων στους απογόνους (Garnier *et al.*, 2001). Εξάιρεση αποτελεί το έντομο *Matsumuratettix hiroglyphicus*

(Matsumura) μιας και μετά τη διατροφή του εντόμου – φορέα σε υγιή φυτά ζαχαρότευτλων έχει διαπιστωθεί η παρουσία του φυτοπλάσματος μετά από δύο γενιές σε έντομα που βρίσκονται στο στάδιο του αυγού, νύμφης και ενήλικου (Hanboonsong *et al.*, 2002).

1.4.2. Μετάδοση με εμβολιασμό

Εκτός των εντόμων, η μετάδοση των φυτοπλάσμάτων από φυτό σε φυτό γίνεται και μέσω του εμβολιασμού (EPPO/CABI, 2006). Επίσης, τα φυτοπλάσματα μεταδίδονται και με τα όργανα αγενούς πολλαπλασιασμού, όπως: μοσχεύματα, ριζώματα, κονδύλους και βολβούς (Lee *et al.*, 2000). Εργαστηριακά πειράματα εμβολιασμού για τη μετάδοση φυτοπλάσμάτων εφαρμόζονται σε ορισμένα είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένου και του γνωστού φυτού – ξενιστή των φυτοπλάσμάτων *Catharanthus roseus* (Lee *et al.*, 2001).

1.4.3. Μετάδοση με το σπερματοφότο παράσιτο κουσκούτα (*Cuscuta* spp.)

Η μετάδοση των φυτοπλάσμάτων γίνεται και μέσω του σπερματοφύτου παρασίτου κουσκούτα (EPPO/CABI, 2006). Εργαστηριακά εφαρμόζεται για την μετάδοση φυτοπλάσμάτων στην περίπτωση που δεν είναι δυνατή η μετάδοσή τους σε υγιή φυτά μέσω του εμβολιασμού. Υπάρχουν τουλάχιστον 17 είδη κουσκούτας, εκ των οποίων δύο είδη, η *Cuscuta campestris* και η *Cuscuta subinclusa*, χρησιμοποιούνται ευρέως για την μετάδοση φυτοπλάσμάτων (Lee *et al.*, 2001).

1.5. Τρόποι αντιμετώπισης των φυτοπλάσμάτων

Η βασική στρατηγική που πρέπει να εφαρμόζεται για την αντιμετώπιση – περιορισμό των ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπλάσματα είναι η λήψη προληπτικών μέτρων, όπως η εφαρμογή των απαραίτητων καλλιεργητικών πρακτικών, η χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, η καταπολέμηση των εντόμων –

φορέων, και η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών σε φυτοπλάσματα (Garnier, 1999; Lee *et al.*, 2000; McCoy, 1982).

Στο παρελθόν, εφαρμόζονταν αντιβιοτικά, όπως οι τετρακυκλίνες, για τον περιορισμό των συμπτωμάτων από φυτοπλάσματα. Τα φυτά δεν θεραπεύονταν μετά την εφαρμογή των τετρακυκλινών, αλλά τα συμπτώματα επανεμφανίζονταν μετά την διακοπή της εφαρμογής τους. Όμως, οι εφαρμογές τετρακυκλινών για μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλούσαν φυτοτοξικότητα στα φυτά (Garnier, 1999; McCoy, 1982). Έτσι, η ανησυχία για τις πιθανές περιβαλλοντικές επιπτώσεις και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα φυτοπλάσματα λόγω των συχνών επεμβάσεων με τετρακυκλίνες, οδήγησαν τελικά στην απαγόρευση της χρήσης τους σε αρκετές χώρες (Garnier, 1999).

Όσον αφορά τις καλλιεργητικές πρακτικές, αφενός συστήνονται οργώματα και σκαλίσματα του εδάφους για την καταστροφή των προνυμφών, όπως για παράδειγμα στο έντομο *H. obsoletus* (Boudon-Padieu, 1999), ζιζανιοκτονία των εναλλακτικών φυτών – ξενιστών (π.χ. διετή ή πολυετή ζιζάνια), καταστροφή των προσβεβλημένων φυτών (σε περιπτώσεις που τα φυτοπλάσματα μεταδίδονται με μονοφάγα έντομα), και αφετέρου περιφρούρηση των γειτονικών αγρών για την αποφυγή μετάδοσης των φυτοπλάσμάτων (Batlle *et al.*, 2000; Del Serrone *et al.*, 2001; Garnier *et al.*, 2001).

Η χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού αποτελεί την ευκολότερη πρακτική για την αντιμετώπιση – περιορισμό των ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπλάσματα. Το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό μπορεί να απαλλαγεί από τα φυτοπλάσματα με ιστοκαλλιέργεια και θερμοθεραπεία. Επιπλέον, συστήνονται χημικές εφαρμογές στα φυτάρια και έλεγχος των εντόμων στα σπορεία (Garnier, 1999).

Από τις πρακτικές που προαναφέρθηκαν η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών πιθανόν να αποτελεί την πιο άμεση και αποτελεσματική στρατηγική για την αντιμετώπιση των φυτοπλάσμάτων. Παρόλα αυτά, όμως, η μεταφορά γονιδίων

ανθεκτικότητας από διάφορα είδη φυτών σε βελτιωμένες καλλιεργούμενες ποικιλίες με την κλασσική γενετική είναι μια εξαιρετικά χρονοβόρα διαδικασία (Lee *et al.*, 2000). Αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις κατά τις οποίες διαφορετικές ποικιλίες μιας καλλιέργειας παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία ως προς τις προσβολές από φυτοπλάσματα, εντούτοις δεν έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ανθεκτικών ποικιλιών (Garnier *et al.*, 1999). Επίσης, μια εναλλακτική μέθοδος είναι η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών ανθεκτικών στις προσβολές από φυτοπλάσματα με την ενσωμάτωση σε αυτές ενός ή περισσότερων γονιδίων (Garnier *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000).

1.6. Γενοτυπική δομή των φυτοπλασμάτων

Το μέγεθος του φυτοπλασματικού γενώματος ποικίλει από 530 μέχρι 2200 kbp (Kamoun and Hogenhout, 2001). Αξίζει να σημειωθεί ότι το μέγεθος του γενώματος άλλων μελών που ανήκουν στην κλάση *Mollicutes* είναι: 580–1300 kbp για τα μέλη του γένους *Mycoplasma* (τάξη *Mycoplasmatales*), 1500-1650 kbp για τα μέλη του γένους *Acholeplasma* (τάξη *Acholeplasmatales*), και 780–2200 kbp για τα μέλη του γένους *Spiroplasma* (Lee *et al.*, 2000; Razin *et al.*, 1998). Παραλλακτικότητα στο μέγεθος του γενώματος δεν παρατηρείται μόνο μεταξύ διαφορετικών ειδών του ίδιου γένους, αλλά και μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους (Razin *et al.*, 1998).

Όπως και τα άλλα μέλη της κλάσεως *Mollicutes*, έτσι και τα φυτοπλάσματα έχουν ένα κυκλικό δίκλωνο χρωμοσωμικό DNA με μικρή περιεκτικότητα βάσεων G και C, περίπου 24-33% (Lee *et al.*, 2000; Razin *et al.*, 1998). Αξίζει να σημειωθεί ότι δύο επιπλέον πλασμίδια έχουν ανιχνευθεί σε φυτοπλάσματα των ομάδων I - Aster yellows group), III – X disease group, VI - Clover proliferation group, και XII - Stolbur group (Lee *et al.*, 2000). Μεταξύ των φυτοπλασμάτων η ομοιότητα ως προς την αλληλουχία βάσεων αγγίζει το ποσοστό 88-90%, ενώ μεταξύ των φυτοπλασμάτων και των ειδών

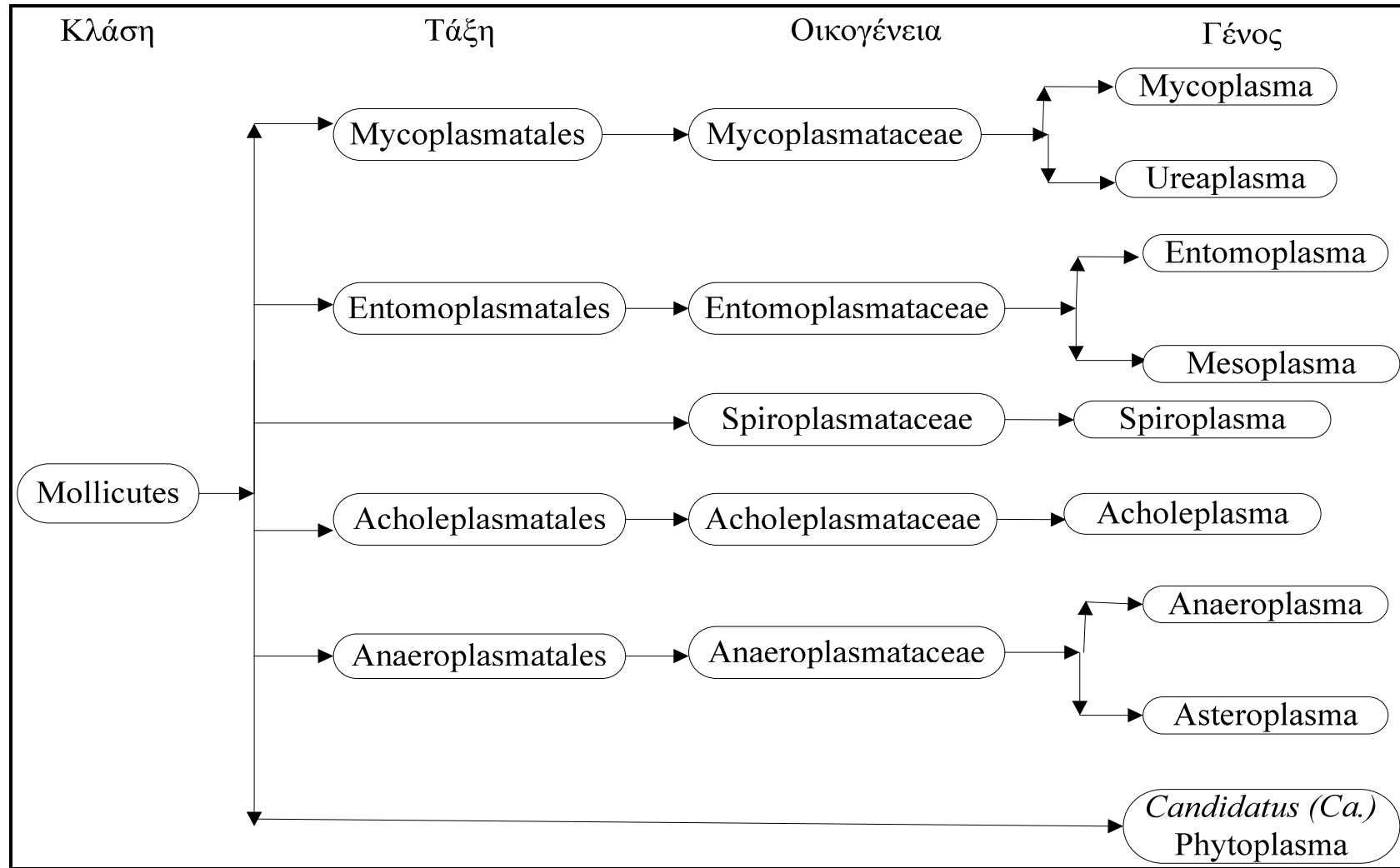
που ανήκουν στο γένος *Acholeplasma* το ποσοστό κυμαίνεται μεταξύ 87 έως 88,5% (Gundersen *et al.*, 1994; Seemüller *et al.*, 1998).

1.7. Ταξινόμηση κατάταξη των φυτοπλάσμάτων

Η κλάση *Mollicutes* (Εικόνα 1) περιλαμβάνει τα φυτοπλάσματα που υπάγονται στο προσωρινό (προκαταρκτικό - *Candidatus*, *Ca.*) γένος *Phytoplasma* (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group, 2004; Razin *et al.*, 1998). Με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών, όπως της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction) και της ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους κλασμάτων περιορισμού DNA (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism), πραγματοποιήθηκε η αναγνώριση και η ταξινόμηση των φυτοπλάσμάτων (Lee *et al.*, 2000).

Η φυλογενετική κατάταξη των προκαρυωτικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των φυτοπλάσμάτων, βασίζεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του 16S rDNA γονιδίου, ή της παρεμβαλλόμενης περιοχής μεταξύ των γονιδίων (Internal Transcribe Spacer – ITS) 16/23S rDNA (Lee, 1999; Seemüller *et al.*, 1998). Η αλληλουχία της περιοχής ITS 16/23S rDNA αποκάλυψε ότι υπάρχει αλληλουχία βάσεων του μεταφορικού RNA ισολευκίνης (tRNA^{ile}) σε όλα τα φυτοπλάσματα (Lee *et al.*, 2000). Τα φυτοπλασματικά γονίδια rDNA έχουν όμοια διάταξη με αυτή των ευκαρυωτικών βακτηρίων: 5' 16S rDNA - ITS 16/23S - 23S rDNA 3' (Lee *et al.*, 2000).

Η κατάταξη των φυτοπλάσμάτων γίνεται με τη χρήση της μεθόδου της PCR, και συγκεκριμένα με τη βοήθεια εκκινητών (Πίνακας 1) που έχουν σχεδιαστεί με βάση την αλληλουχία του 16/23S rDNA γονιδίου (Lee *et al.*, 2000). Με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων τα προϊόντα της PCR κόβονται σε συγκεκριμένα σημεία, οπότε το μέγεθος και ο αριθμός των τμημάτων DNA που προκύπτουν είναι διαφορετικά μεταξύ των



Εικόνα 1. Ταξινομική κατάταξη των μελών της κλάσης *Mollicutes* (προσαρμογή από Razin *et al.*, 1998)

φυτοπλασμάτων (Lee *et al.*, 1998a). Πρόκειται για μια απλή, γρήγορη και αρκετά αξιόπιστη μέθοδο κατάταξης των φυτοπλασμάτων σε 20 ομάδες (από I έως XX) και 41 υποομάδες (Seemüller *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 1999).

1.8. Μέθοδοι ανίχνευσης των φυτοπλασμάτων

Η διάγνωση των ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπλάσματα αρχικά βασίστηκε στα χαρακτηριστικά συμπτώματα που εμφάνιζαν τα ασθενή φυτά, τα οποία και διέφεραν από τα συμπτώματα που οφείλονταν σε άλλα παθογόνα (Lee *et al.*, 1998a). Οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση των φυτοπλασμάτων και περιγράφονται παρακάτω είναι: μικροσκοπικές τεχνικές, ορολογικές δοκιμές, και μοριακές τεχνικές που βασίζονται στο φυτοπλασματικό DNA.

1.8.1. Μικροσκοπικές τεχνικές

Μετά από χρώση λεπτών τομών φυτικών ιστών με τη φθορίζουσα ουσία DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) ή τη χρωστική Dienes τα αγγεία του ηθμού αποκτούν ένα σκούρο μπλε χρώμα, ενώ τα φυτοπλάσματα έχουν τη μορφή μπλε κηλίδων, με αποτέλεσμα να διακρίνονται εύκολα με το οπτικό μικροσκόπιο (Lee *et al.*, 2001).

Η χρησιμοποίηση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης έχει βρει ευρεία εφαρμογή στην ανίχνευση των φυτοπλασμάτων (Musetti and Favali, 2004). Επίσης, στην ανίχνευση φυτοπλασμάτων χρησιμοποιείται η ανοσοπροσροφητική ηλεκτρονική μικροσκοπία (Musetti and Favali, 2004), όπου το πλέγμα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου επωάζεται με αντιγόνο για συγκεκριμένο αντιγονικό προσδιοριστή του φυτοπλάσματος. Έτσι, όταν στο πλέγμα τοποθετείται φυτικός χυμός ασθενούς φυτού από φυτοπλάσματα, να παγιδεύεται το ομόλογο αντιγόνο των φυτοπλασμάτων. Μετά από αρνητική χρώση με βαρέα μέταλλα τα φυτοπλάσματα είναι ορατά με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Baker *et al.*, 1985).

Επιπλέον, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν φθορίζουσες ουσίες, όπως DAPI ή Hoechst 33258 (παράγωγο βενζιμιδαζόλης) για την ανίχνευση φυτοπλάσμάτων με τη βοήθεια του μικροσκοπίου φθορισμού. Τα αγγεία του ηθμού αποκτούν ένα μπλε φθορίζον χρώμα, ενώ τα φυτοπλάσματα φαίνονται ως λευκές φθορίζουσες κηλίδες. Επίσης, χρησιμοποιείται το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου τα φυτοπλάσματα είναι ορατά στους ηθμοσωλήνες των προσβεβλημένων φυτών, και εμφανίζονται ως μικρού μήκους, διακλαδισμένες και νηματοειδείς μορφές (Musetti and Favali, 2004).

Η ανοσοσήμευση με χρυσό εφαρμόζεται με επιτυχία στην ανίχνευση φυτοπλάσμάτων στα φυτά – ξενιστές και στα έντομα – φορείς (Musetti and Favali, 2004). Το πλέγμα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου επιστρώνεται με φιλμ πλαστικού, στο οποίο τοποθετείται λεπτή τομή φυτικού ιστού ασθενούς φυτού προσβεβλημένου από φυτοπλάσματα, και επώάζεται αρχικά με μονοκλωνικά αντισώματα κουνελιού και στη συνέχεια με κουνελιού αντί-κατσίκας αντίσωμα που είναι συζευγμένο με κολλοειδή χρυσού (Musetti and Favali, 2004; Scottish Crop Research Institute, 2002).

Επιπλέον, ο ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται στην ανίχνευση των φυτοπλάσμάτων. Διακρίνεται σε άμεσο και έμμεσο ανοσοφθορισμό. Στον άμεσο ανοσοφθορισμό, το αντίσωμα του ομόλογου αντιγόνου είναι προσημασμένο με μια φθορίζουσα ουσία (π.χ. fluorescein isothiocyanate - FITC), ώστε τα φυτοπλάσματα μετά από επώαση με σημασμένα αντισώματα να είναι ορατά με το μικροσκόπιο φθορισμού. Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό, τα φυτικά κύτταρα αρχικά υπόκεινται σε μονιμοποίηση και σε διαπερατοποίηση των κυτταρικών μεμβρανών, ώστε να είναι διαπερατές για τα αντίστοιχα αντισώματα. Στη συνέχεια, οι αντιγονικοί προσδιοριστές των φυτοπλάσμάτων αναγνωρίζονται από αντισώματα κουνελιού, τα οποία αυτά αναγνωρίζονται από αντίσωμα κατσίκας που είναι προσημασμένο με κάποια φθορίζουσα ουσία (Musetti and Favali, 2004).

1.8.2. Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA (Enzyme – linked immunosorbent assay, ELISA)

Η ELISA χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση συγκεκριμένων φυτοπλάσμάτων, χωρίς όμως με μεγάλη επιτυχία, μιας και απαιτείται η απόκτηση υψηλής ποιότητας αντιορού από προσβεβλημένα από φυτοπλάσματα φυτά, ο οποίος θα είναι απαλλαγμένος από φυτικά συστατικά. Κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί για όλα τα φυτοπλάσματα. Για αυτό το λόγο η εφαρμογή αυτής της τεχνικής είναι περιορισμένη και βρίσκει εφαρμογή στη διάγνωση συγκεκριμένων φυτοπλάσμάτων (Lee *et al.*, 1999). Η ELISA είναι μια αρκετά εύκολη, γρήγορη και οικονομική μέθοδος, καθώς ακόμη βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε πειράματα και σε αναλύσεις ρουτίνας (Lee *et al.*, 1998a).

1.8.3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης

1.8.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction)

Για την αξιόπιστη ανίχνευση των φυτοπλάσμάτων απαιτείται μια μέθοδος με μεγάλη ευαισθησία που να μπορεί να ανιχνεύσει τα φυτοπλάσματα ακόμη και όταν βρίσκονται σε μικρές ποσότητες μέσα στο φυτό. Μια τέτοια μέθοδος είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης - PCR (Lee, 1999).

Πρόκειται για μια μέθοδο που παράγεται *in vitro* σε μικρό χρονικό διάστημα ένας τεράστιος αριθμός αντιγράφων ενός τμήματος DNA με τη χρησιμοποίηση δυο τεχνητών αλληλουχιών μικρού μήκους που ονομάζονται εκκινητές (primers). Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικές αλληλουχίες με τις αλληλουχίες του DNA – στόχου σε αντίθετες αλυσίδες. Από τις αρχές του 1990 οι εκκινητές (γενικευμένοι ή εξειδικευμένοι) που χρησιμοποιούνται στην ταυτοποίηση και ταξινόμηση των φυτοπλάσμάτων σχεδιάζονται

με βάση τη διατηρημένη αλληλουχία του γονιδίου 16S rDNA, αλλά και τελευταία με βάση την περιοχή ITS 16S-23S rDNA (Lee *et al.*, 2000). Γενικευμένοι (universal) εκκινητές είναι αυτοί που με τη βοήθειά τους ανιχνεύεται η ύπαρξη οποιασδήποτε ομάδας φυτοπλάσμάτων (Lee *et al.*, 2000), ενώ εξειδικευμένοι (group specific) είναι οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση συγκεκριμένης ομάδας φυτοπλάσμάτων (Lee *et al.*, 2001). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται ζεύγη γενικευμένων εκκινητών για την ανίχνευση φυτοπλάσμάτων και εξειδικευμένων εκκινητών για την ανίχνευση φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur".

1.8.3.2. Εστιασμένη PCR ("nested PCR")

Πρόκειται για μία δεύτερη PCR, στην οποία χρησιμοποιούνται εκκινητές που υβριδίζουν εντός του προϊόντος της πρώτης αντίδρασης PCR. Σκοπό έχει να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση στην ανίχνευση των φυτοπλάσμάτων. Η "nested PCR" βρίσκει εφαρμογή στις περιπτώσεις που η ποσότητα του φυτοπλασματικού DNA στους προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς είναι μικρή ή υπάρχουν μεταβολίτες που παρεμποδίζουν την PCR. Χρησιμοποιώντας γενικευμένους εκκινητές κατά την PCR, και εξειδικευμένους εκκινητές κατά την "nested PCR" είναι δυνατόν να διαγνωστούν περισσότερα του ενός φυτοπλάσματα (Lee *et al.*, 1999).

1.8.3.3. Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους κλασμάτων περιορισμού DNA (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)

Η μέθοδος των RFLPs βασίζεται στην πέψη του προϊόντος PCR με περιοριστικά ένζυμα. Τα τμήματα διαφορετικού μεγέθους που προκύπτουν διαχωρίζονται και γίνονται ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη ή πολυακρυλαμίδης (Lee *et al.*, 1998b). Η αξία της μεθόδου είναι μεγάλη, μιας και χρησιμοποιείται στην ταξινομική κατάταξη των φυτοπλάσμάτων σε ομάδες (Lee *et al.*, 1999).

Πίνακας 1. Ζεύγη γενικευμένων εκκινητών για την ανίχνευση φυτοπλασμάτων και εξειδικευμένων εκκινητών για την ανίχνευση φυτοπλασμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" (προσαρμογή από Lee *et al.*, 2001; Maixner *et al.*, 1995; Marzachi *et al.*, 2000)

Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία εκκινητών (5' - 3')	Στόχος	Αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR (bp)
P1	aagagtttgatcctggctcaggatt	16SrDNA	1800
P7	cgctcttcacggctctt	23DNA	
R16F1	aagacgaggataacagttgg	16SrDNA	1354
R16R0	ggataccttgttacgacttaacccc	16SrDNA	
R16mF2	catgcaagtgcgaacgga	16SrDNA	1435
R16mR1	cttaaccccaatcatcgac	16SrDNA	
R16F2	acgactgctgctaagactgg	16SrDNA	1248
R16R2	tgacgggcggtgtgtacaaaccccg	16SrDNA	
R16F2n	gaaacgactgctaagactgg	16SrDNA	1248
R16R2	tgacgggcggtgtgtacaaaccccg	16SrDNA	
fU5	cggcaatggaggaaact	16SrDNA	882
rU3	ttcagctactctttgtaaca	16SrDNA	
P1	aagagtttgatcctggctcaggatt	16SrDNA	1600
Tint	tcaggcgtgtgctctaaccagc	ITS	
SN910601	cctcagcgtcagtaa	16SrDNA	746
SN920204	gtctttactgacgctgaggc	16SrDNA	
16R758F	gtctttactgacgctgaggc	16SrDNA	513
16R1232R	cttcagctaccctttgtaac	16SrDNA	
fStol	gccatcattaagttgggga	16SrDNA	570
rStol	agatgtgacctatttggtgg	ITS	

1.8.4. Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης φυτοπλάσμάτων

Άλλες μέθοδοι που εφαρμόζονται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των φυτοπλάσμάτων, είναι:

- ✓ Εφαρμογή αντιβιοτικών (τετρακυκλίνες και πενικιλίνες, οι οποίες παρεμποδίζουν την πρωτεϊνική σύνθεση και τη δράση του ενζύμου peptidoglycan transpeptidase, αντίστοιχα) σε προσβεβλημένα φυτά από φυτοπλάσματα. Μετά από τη χορήγηση τετρακυκλίνης στα ασθενή φυτά τα συμπτώματα υποχωρούν, ενώ τα συμπτώματα παραμένουν μετά από τη χορήγηση πενικιλίνης (Alivizatos, 1989; Alivizatos, 1993; McCoy, 1982).
- ✓ Πειράματα μετάδοσης του φυτοπλάσματος από ασθενή φυτά σε υγιή φυτά βίνκας (*Catharanthus roseus* ή *Vinca rosea*) μέσω της κουσκούτας (*Cuscuta campestris* L.). Μετά από μερικές ημέρες η βίνκα παρουσιάζει συμπτώματα των ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπλάσματα (Alivizatos, 1989; Castro and Romero, 2002).

2. Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ "STOLBUR" ΣΤΗΝ ΤΟΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΕ ΑΛΛΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΦΥΤΑ

2.1. Γενικά

Η ασθένεια "stolbur" αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1932 στην Τσεχοσλοβακία, ενώ αργότερα έγινε αναφορά και σε άλλες χώρες, όπως: πρώην ΕΣΣΔ, Ουγγαρία, Αυστρία, Γαλλία, Ελβετία, Ιταλία, πρώην Γιουγκοσλαβία, Βουλγαρία, Ρουμανία, Ηνωμένο Βασίλειο, Σαουδική Αραβία και Ιράκ. Στην χώρα μας για πρώτη φορά η ασθένεια αναφέρθηκε στη Βόρεια Ελλάδα το 1985, αν και πιθανώς προϋπήρχε στην περιοχή από το 1965. Επίσης, το 1989 διαπιστώθηκε η παρουσία προσβεβλημένων φυτών βιομηχανικής τομάτας (*Lycopersicon esculentum* Mill.) σε υπαίθριες καλλιέργειες στην Κεντρική Ελλάδα, Αττική και Κέρκυρα (Alivizatos, 1989).

2.2. Κατάταξη των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" σε καλλιεργούμενα φυτά

Τα φυτοπλάσματα που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" στην τομάτα και σε άλλους ξενιστές κατατάσσονται κυρίως στην ομάδα 16S rDNA XII. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ταξινομική κατάταξη του φυτοπλάσματος που είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της ασθένειας "stolbur" στην πιπεριά μιας και υπάρχουν αναφορές ότι ανήκει στην ομάδα 16S rDNA XII – Stolbur group (στη Σερβία) και στην ομάδα 16S rDNA VI - Clover proliferation group (στην Ισπανία). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η ταξινομική κατάταξη των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" στην τομάτα και σε άλλους ξενιστές (Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1998b; Laviña and Batlle, 2002; Seruga *et al.*, 2000; Batlle *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2003; Castro and Romero, 2002; Bertaccini *et al.*, 1999; Del Serrone *et al.*, 2001; Terlizzi *et al.*, 2006).

Το μέγεθος του γενώματος των φυτοπλάσμάτων που ανήκουν στην ομάδα "stolbur" (16S rDNA XII) και προσβάλλουν διάφορα καλλιεργούμενα φυτά, ποικίλλει από 860 μέχρι 1350 kbp (Πίνακας 3). Αν και το μέγεθος του γενώματος δύο διαφορετικών στελεχών του ίδιου φυτοπλάσματος που προσβάλλουν το σέλινο (*Apium graveolens*) είναι το ίδιο (980 kbp), δεν ισχύει κάτι τέτοιο στο αμπέλι (*Vitis vinifera*), μιας και το γένωμα όλων των στελεχών έχει διαφορετικό μέγεθος (860-1080 kbp). Τα στελέχη MOL και STOLF που προσβάλλουν τη βυσσινιά (*Prunus cerasus*) και την τομάτα (*Lycopersicon esculentum*) αντίστοιχα, παρουσιάζουν το μεγαλύτερο μέγεθος γενώματος. Το μέγεθος του γενώματος (kbp) διαφόρων στελεχών φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" σε διάφορα φυτά – ξενιστές δίνονται στον Πίνακα 3 (Marccone *et al.*, 1999).

Πίνακας 2. Ταξινομική κατάταξη των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" σε καλλιεργούμενα φυτά (στην τομάτα και σε άλλους ξενιστές)

Φυτό - Ξενιστής	Γεωγραφική κατανομή	Ομάδα φυτοπλάσματος	Παραπομπή
Αβοκάντο	Ιταλία	16S rDNA XII	Laviña and Batlle, 2002
Αμπέλι	Κροατία	16S rDNA XII-A	Seruga <i>et al.</i> , 2000
Αμπέλι	Σερβία	16S rDNA XII-A	Seruga <i>et al.</i> , 2000
Αμπέλι, περικοκλάδα, αγρισίκαλη, λεβάντα, αγριοτομάτα	Ισπανία	16S rDNA XII-A	Battle <i>et al.</i> , 2000
Μανιτάρια	Ισπανία	16S rDNA XII	Martin <i>et al.</i> , 2003
Πιπεριά	Ισπανία	16S rDNA VI	Castro and Romero, 2002
Πιπεριά	Σερβία	16S rDNA XII	Lee <i>et al.</i> , 1998b; Schneider <i>et al.</i> , 1997b
Πράσο	Ιταλία, Τσεχία	16S rDNA XII-A	Bertaccini <i>et al.</i> , 1999
Τομάτα	Ιταλία	16S rDNA XII	Del Serrone <i>et al.</i> , 2001
Φράουλα	Ιταλία	16S rDNA XII-A	Terlizzi <i>et al.</i> , 2006

Πίνακας 3. Διάφορα στελέχη και μέγεθος γενώματος (kbp) φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" σε διάφορα φυτά – ξενιστές (προσαρμογή από Marcone *et al.*, 1999)

Φυτό - Ξενιστής	Γεωγραφική κατανομή	Στέλεχος	Μέγεθος γενώματος (kbp)
Αμπέλι	Ιταλία	CA-1	1070
Αμπέλι	Ιταλία	CH-1	945
Αμπέλι	Ιταλία	SA-1	1020
Αμπέλι	Ιταλία	SA-2	1080
Αμπέλι	Γερμανία	GGY1	860
Βυssινιά	Γαλλία	MOL	1220
Λεβάντα	Γαλλία	DEPL	990
Πιπεριά	Σερβία	STOL	900
Σέλινο	Ιταλία	CeY1	980
Σέλινο	Ιταλία	CeY2	980
Τομάτα	Γαλλία	STOLF	1350

2.3. Εύρος ξενιστών των φυτοπλασμάτων της ομάδας XII (Stolbur group)

Οι κύριοι ξενιστές των φυτοπλασμάτων της ομάδας XII (Stolbur group) εκτός της είναι: η τομάτα - *Lycopersicon esculentum* Mill., η πιπεριά - *Capsicum anuum*, η πατάτα - *Solanum tuberosum* και η μελιτζάνα - *Solanum melongena* (Curković Perica *et al.*, 2001). Τα συγκεκριμένα φυτοπλάσματα έχουν έναν ευρύ κύκλο ξενιστών με φυτά που ανήκουν σε τουλάχιστον 16 είδη 6 οικογενειών (EPPO/CABI, 2006). Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται ποώδη ζιζάνια, σποροκηπευτικά και δένδρα, όπως: περικοκλάδα - *Convolvulus arvensis*, αγριοτομάτα - *Solanum nigrum*, πεντάνευρο - *Plantago lanceolata*, βάτος - *Rubus* sp., βρωμολάχανο - *Lepidium draba*, τραχύ βλήτο - *Amaranthus retroflexus*, λουβουδιά - *Chenopodium album*, κίρσιο - *Cirsium arvense*, λεβάντα - *Lavandula officinalis*, αμυγδαλιά - *Prunus dulcis* (Batlle *et al.*, 2000; Maixner *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1997a), αμπέλι - *Vitis vinifera*, σέλινο - *Apium graveolens*, βυσσινιά - *Prunus cerasus* (Marccone *et al.*, 1999), αχλαδιά - *Pyrus communis* sativa, νεκταρινιά - *Persica laevis* (Curković Perica *et al.*, 2001), μηδική - *Medicago sativa* (Pilkington *et al.*, 2003), πράσο - *Allium ampeloprasum* L. var. *porrum* (Bertaccini *et al.*, 1999), αβοκάντο - *Persea americana* (Laviña and Batlle, 2002), μανιτάρια - *Ramaria* spp. (Martin *et al.*, 2003), και φράουλα - *Fragaria X ananassa* (Terlizzi *et al.*, 2006).

2.4. Συμπτώματα της ασθένειας "stolbur"

Τα συμπτώματα που εμφανίζονται στην τομάτα είναι: κιτρινοπράσινο χρώμα στην περιφέρεια των υπαρχόντων φύλλων, κατσάρωμα φύλλων, μικροφυλλία, χλώρωση, λέπτυνση βλαστών στην κορυφή και πάχυνση στα σημεία προσβολής λόγω του ανώμαλου σχηματισμού στα αγγεία του ηθμού, σκούπα της μάγισσας, παραμορφωμένα άνθη (πρασίνισμα, συνδεδεμένα ή χωριστά υπερμεγέθη σέπαλα με νευρώσεις ερυθρού χρώματος, επιμηκυμένο ύπερο, υποτυπώδεις στήμονες, πάχυνση ποδίσκου), στειρότητα

ανθέων, μικροκαρπία, πάχυνση ποδίσκου των καρπών (EPPO/CABI, 2006; Pracros *et al.*, 2006).

Τα συμπτώματα των προσβεβλημένων φυτών πιπεριάς, είναι: βραχυγονάτωση, γιγαντοφθαλμία, πρασίνισμα ή χλωρανθία, σέπαλα που δεν είναι χωρισμένα μεταξύ τους, και αποτυχία καρπόδεσης (Castro and Romero, 2002).

Τα προσβεβλημένα φυτά πατάτας εμφανίζουν τα παρακάτω συμπτώματα: νημάτωση, ίκτερος, καρούλιασμα φύλλων, εναέριοι στόλωνες, έκπτυξη εναέριων κονδύλων στις μασχάλες των φύλλων. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται 60-80 ημέρες μετά την σπορά (EPPO/CABI, 2006).

Τα συμπτώματα προσβολής στο αμπέλι από τις ασθένειες "Flavescence dorée", "Bois noir" και "Vergilbungskrankheit", οι οποίες προκαλούνται από φυτοπλάσματα της υπο-ομάδας "stolbur", είναι: χλώρωση, επιναστία, μη λιγνιτοποίηση των βλαστών, μαρασμός των ανθέων και των ρωγών, ο οποίος συνεπάγεται μειωμένη ποιότητα και ποσότητα των παραγόμενων καρπών, μείωση της ζωτικότητας του αμπελώνα, παραγωγή ραγών με υψηλή περιεκτικότητα σε οξέα και χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, σκούπα της μάγισσας, νέκρωση των προσβεβλημένων αμπελιών μέσα σε 2-3 χρόνια (Boudon-Padieu, 1999; Curković Perica *et al.*, 2000). Επιπλέον, το φυτόπλασμα που προκαλεί την ασθένεια "Bois noir" αναστέλλει την λειτουργία του φωτοσυστήματος II (PSII), ενώ στα προσβεβλημένα φύλλα παρατηρείται μείωση του ποσού της χλωροφύλλης, καροτενοειδών, υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, αναστολή των δραστηριοτήτων των ενζύμων της νιτρικής και νιτρώδους ρεδουκτάσης, της καρβοξυλάσης της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης, και αύξηση των υδατοδιαλυτών σακχάρων και των ολικών σακχαριτών (Bertamini *et al.*, 2001).

2.5. Έντομα - φορείς των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" σε καλλιεργούμενα φυτά

Ο φυλλοτέττιγης *Hyalosthes obsoletus* θεωρείται το πιο σημαντικό έντομο – φορέας της ασθένειας "stolbur" στην Ανατολική Ευρώπη (EPPO/CABI, 2006), και ένας από τους σημαντικότερους φορείς του φυτοπλάσματος στο αμπέλι, στην τομάτα και στην πατάτα (Institute for Plant Protection and Environment Belgrade, 2004). Άλλα έντομα-φορείς των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" δίνονται στον Πίνακα 4. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι: *Hyalosthes phytoplasmakosiewiczzi*, *Aphrodes bicinctus*, *Euscelis plebeja*, *Lygus pratensis*, *Lygus rugulipennis*, *Lygus gemellatus* και *Macrosteles quadripunctulatus* (EPPO/CABI, 2006). Παρόλο που διεθνώς εμφανίζονται εργασίες προσδιορισμού των εντόμων – φορέων των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur", στη χώρα μας δεν έχει καταστεί ακόμη δυνατή η αναγνώριση εντόμων – φορέων των φυτοπλάσμάτων.

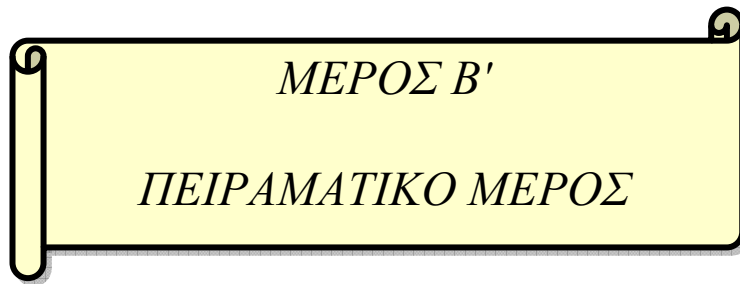
Η μετάδοση των φυτοπλάσμάτων από τα έντομα φορείς εξαρτάται από τον πληθυσμό των εντόμων στην περιοχή και από την ικανότητά μετακίνησής των φορέων από το ένα φυτό στο άλλο, η οποία επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, την ηλικία του φυτού – ξενιστή, την πυκνότητα των φυτών, και σε ορισμένες περιπτώσεις από το γένος του εντόμου (Orenstein *et al.*, 2001). Η ασθένεια είναι δυνατόν να λάβει επιδημικές διαστάσεις κατά τη διάρκεια θερμού και ξηρού καλοκαιριού, όπως για παράδειγμα στην Βοσνία-Ερζεγοβίνη το 1955 και το 1964. Επομένως, μεγαλύτερες προσβολές παρατηρούνται όταν οι κλιματικές συνθήκες ευνοούν τη μετανάστευση των εντόμων – φορέων του φυτοπλάσματος από περιοχές όπου υπάρχουν προσβεβλημένα φυτά σε περιοχές με υγιή φυτά – ξενιστές του φυτοπλάσματος (EPPO/CABI, 2006).

2.6. Σκοπός της εργασίας

Το θέμα που πραγματεύεται η παρούσα εργασία είναι ο γενετικός χαρακτηρισμός των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" της τομάτας στην Ελλάδα. Σκοπός της εργασίας είναι να ανιχνευθεί με μοριακές τεχνικές η παρουσία φυτοπλάσμάτων σε ασθενή φυτά τομάτας, και στη συνέχεια να καθοριστεί η ταξινομική ομάδα στην οποία ανήκουν τα φυτοπλάσματα που προκαλούν την ασθένεια "stolbur". Στα πλαίσια αυτής της εργασίας εξετάστηκε με μοριακές τεχνικές η παρουσία φυτοπλάσμάτων σε ημίπτερα έντομα, καθώς ακόμη πραγματοποιήθηκαν δοκιμές απομόνωσης φυτοπλασματικών κυττάρων από το θρεπτικό διάλυμα διατροφής των εντόμων. Ακόμη διερευνήθηκε η πιθανότητα μετάδοσης των φυτοπλάσμάτων από ασθενή φυτά τομάτας σε υγιή φυτά τομάτας και βίνκας μέσω δοκιμών παρασιτισμού της κουσκούτας σε υγιή φυτά. Μ' αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η διατήρηση ζωντανών φυτοπλάσμάτων σε ασθενή φυτά για την διεξαγωγή πειραμάτων μετάδοσης των φυτοπλάσμάτων με ημίπτερα έντομα.

Πίνακας 4. Έντομα – φορείς φυτοπλάσμάτων της ομάδας "stolbur" (16S rXII)

Φυτό - Ξενιστής	Ασθένεια	Έντομο - Φορέας	Παραπομπή
Αμπέλι	"Bois Noir", "Vergilbungskrankheit"	<i>Hyalesthes obsoletus</i>	Boudon-Padieu, 1999
Αμπέλι	"stolbur"	<i>Neoliturus fenestratus</i> , <i>Circulifer haematoceps</i> , <i>Hyalesthes obsoletus</i> , <i>Macrosteles quadripunctulatus</i>	Orenstein <i>et al.</i> , 2001
Αμπέλι	"stolbur"	<i>Hyalestes obsoletus</i>	Battle <i>et al.</i> , 2000; Milkus <i>et al.</i> , 2005
Αμπέλι	"Vergilbungskrankheit"	<i>Hyalesthes obsoletus</i>	Maixner <i>et al.</i> , 1995
Αμπέλι	"stolbur"	<i>Reptalus panzeri</i>	Institute for Plant Protection and Environment Belgrade, 2004
Αμπέλι, περικοκλάδα, τσουκνίδα	"stolbur"	<i>Hyalesthes obsoletus</i> , <i>Aphrodes macaroni</i> , <i>Euscelis incisus</i> , <i>Anoplottetix fuscovenosus</i> , <i>Neoliturus fenestratus</i> , <i>Emboasca vitis</i>	Petrovic <i>et al.</i> , 2003
Αμπέλι, τομάτα, πατάτα	"stolbur"	<i>Hyalestes obsoletus</i>	Institute for Plant Protection and Environment Belgrade, 2004
Βίνκα, ζαχαρότευτλα	"stolbur"	<i>Pentastiridius beieri</i>	Gatineau <i>et al.</i> , 2001



ΜΕΡΟΣ Β'
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως παρουσιάζεται στη διεθνή βιβλιογραφία η γενοτυπική κατάταξη των φυτοπλάσμάτων γίνεται με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών. Στο παρελθόν οι μελέτες που είχαν διεξαχθεί στη χώρα μας αφορούσαν την ανίχνευση των φυτοπλάσμάτων με βάση τη συμπτωματολογία καθώς και τις παρατηρήσεις με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Alivizatos, 1989; Alivizatos, 1993; Ρούμπος 1985α; Ρούμπος 1985β). Το 1994 για πρώτη φορά στη χώρα μας πραγματοποιήθηκε ανίχνευση φυτοπαθογόνων μυκοπλασμάτων σε φυτά βίνκας, τομάτας, βερικοκιάς, και μηλιάς με PCR (Αλιβιζάτος και Γλυνός, 1994). Πρόσφατα, στην Ελλάδα ο Σαΐνης και οι συνεργάτες του σχεδίασαν εξειδικευμένους εκκινητές και με τη βοήθεια της "nested PCR" διαπίστωσαν την παρουσία φυτοπλάσμάτων της ομάδας XII – Stolbur group σε φυτά τομάτας, πιπεριάς, καπνού, αμπέλου, και σε ζιζάνια (κίρσιο - *Cirsium arvense*, αγριομελιτζάνα - *Xanthium strumarium*, περικοκιάδα - *Convolvulus arvensis*, αγριοτοματιά - *Solanum nigrum*) (Σαΐνης κ.α., 2006).

Στην παρούσα εργασία, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, πραγματοποιήθηκε η γενοτυπική κατάταξη των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" στην τομάτα με μοριακές τεχνικές, όπως η PCR, και με τη χρησιμοποίηση εξειδικευμένων εκκινητών (fStol/rStol). Παρακάτω αναφέρονται μερικές από τις έρευνες που έχουν διεξαχθεί για την κατάταξη των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν της ασθένεια "stolbur" σε διάφορα καλλιεργούμενα φυτά, ζιζάνια και έντομα, και στηρίζονται σε PCR με χρήση των εκκινητών fStol/rStol. Οι Del Serrone *et al.* (2001) χρησιμοποιώντας το ζεύγος γενικευμένων εκκινητών P1/P7 διαπίστωσαν αρχικά την παρουσία φυτοπλάσμάτων σε ασθενή φυτά τομάτας, στη συνέχεια με χρήση του ζεύγους εξειδικευμένων εκκινητών fStol/rStol απέδειξαν ότι τα φυτοπλάσματα ανήκουν στην ομάδα XII - Stolbur group. Επίσης, οι Marzachi *et al.* (2000) μετά από PCR με χρήση γενικευμένων εκκινητών (R16F2/R2) παρατήρησαν την παρουσία φυτοπλάσμάτων σε

ασθενή φυτά τομάτας, σέλινου, αμπελιού και περικοκλάδας, ενώ μετά από PCR με το ζεύγος εξειδικευμένων εκκινητών fStol/rStol διαπίστωσαν την παρουσία φυτοπλασμάτων της ομάδας XII. Σε ασθενή φυτά φράουλας, διαπιστώθηκε η ύπαρξη φυτοπλασμάτων μετά από PCR με τους εκκινητές P1/P7, και στη συνέχεια με PCR με τους εκκινητές fStol/rStol βρέθηκε ότι τα φυτοπλάσματα ανήκουν στην ομάδα XII (Terlizzi *et al.*, 2006). Επιπλέον, οι Maixner *et al.* (1995) με PCR με το ζεύγος εξειδικευμένων εκκινητών fStol/rStol απέδειξαν την ύπαρξη φυτοπλασμάτων της ομάδας XII σε φυτά αμπελιού και βίνκας, και στο έντομο *Hyalosthes obsoletus*, το οποίο είναι φορέας της ασθένειας "stolbur".

Η ασθένεια "stolbur", συγγέεται συχνά με την ασθένεια γιγαντοφθαλμία ("big bud") της τομάτας. Στα Ρωσικά η λέξη "stolbur" μεταφράζεται ως "big bud" στα Αγγλικά, με αποτέλεσμα να υπάρχει κάποια σύγχυση μεταξύ των δύο ασθενειών στη βιβλιογραφία (EPPO/CABI, 2006). Οι ασθένειες γιγαντοφθαλμία και "stolbur" έχουν κοινά συμπτώματα, όπως: μικροφυλλία, μικροκαρπία, νανισμός, σκούπα της μάγισσας, και πρασίνισμα ή χλωρανθία. Παρόλα αυτά, όμως, τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας γιγαντοφθαλμία είναι: νημάτωση, βραχυγονάτωση, στενοί και βραχείς μίσχοι φύλλων και ανθέων, υπερμεγέθη άνθη, γιγαντοφθαλμία και φυλλωδία, συμπτώματα που δεν παρατηρούνται στην ασθένεια "stolbur" (Alivizatos, 1993). Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας "stolbur" παρουσιάζονται εκτενώς στην παράγραφο 2.4.

Κατά τον εμβολιασμό υγιών φυτών βίνκας (υποκείμενο) με προσβεβλημένα φυτά πιπεριάς (υπερκείμενο) με "stolbur", προέκυψαν φυτά πιπεριάς με συμπτώματα "stolbur", ενώ κατά τον εμβολιασμό υγιών φυτών τομάτας με φυτά τομάτας με συμπτώματα της ασθένειας γιγαντοφθαλμία, προέκυψαν φυτά με συμπτώματα της ασθένειας γιγαντοφθαλμία. Επομένως, είναι φανερό ότι πρόκειται για διαφορετικά φυτοπλάσματα που προκαλούν τις ασθένειες γιγαντοφθαλμία και "stolbur" (Alivizatos, 1993; Castro and Romero, 2002).

Η παρούσα μελέτη διενεργήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με στόχο αφενός τη διαπίστωση της παρουσίας και τον γενοτυπικό χαρακτηρισμό των φυτοπλασμάτων σε ασθενή φυτά τομάτας, και αφετέρου την ανίχνευση φυτοπλασμάτων σε ημίπτερα έντομα με μοριακές τεχνικές. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παρασιτισμού κουσκούτας σε υγιή φυτά τομάτας και βίνκας με στόχο τη μετάδοση των φυτοπλασμάτων από ασθενή σε υγιή φυτά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Συλλογή φυτών τομάτας προσβεβλημένων από φυτοπλάσματα

3.1.1. Συλλογή των δειγμάτων

Βλαστοί και φύλλα από ασθενή φυτά βιομηχανικής και επιτραπέζιας τομάτας με τυπικά συμπτώματα της ασθένειας "stolbur" (Εικόνα 2) συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2005 και 2006. Επίσης, δείγματα ελήφθησαν και από προσβεβλημένα φυτά τομάτας με συμπτώματα της ασθένειας γιγαντοφθαλμία (Εικόνα 3), με χαρακτηριστικό ιώδη μεσονεύριο χαρακτηρισμό των φύλλων (Εικόνα 4) αλλά και με συμπτώματα που δεν κατατάσσονται στις προηγούμενες κατηγορίες (φυτά με μικτά συμπτώματα των ασθενειών "stolbur" και γιγαντοφθαλμία, και φυτά με έντονα συμπτώματα μαρασμού, συστροφής και ιώδους μεσονεύριου μεταχρωματισμού των φύλλων, και ξήρανσης), προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη του φυτοπλάσματος της ομάδας XII - Stolbur group (Πίνακας 5). Η πλειονότητα των φυτών που συλλέχθηκαν εμφάνιζαν συμπτώματα παρόμοια με προσβολή από φυτοπλάσματα (παράγραφος 2.4). Ο ιώδης μεσονεύριος μεταχρωματισμός των φύλλων τομάτας δεν αναφέρεται στην διεθνή βιβλιογραφία ως τυπικό σύμπτωμα προσβεβλημένων από φυτοπλάσματα.

Η συλλογή δειγμάτων ασθενών φυτών τομάτας από φυτοπλάσματα πραγματοποιήθηκε από τον κ. Ε. Βέλλιο και την κ. Φ. Λιολιοπούλου. Στη συνέχεια τα συλλεχθέντα δείγματα (βλαστοί και φύλλα) μεταφέρθηκαν σε ψυγείο με παγοκύστες στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και φυλάσσονταν στους – 80 °C μέχρι περαιτέρω χρήσης.

3.2.2. Μέτρηση συχνότητας ασθένειας στον αγρό

Για τη μέτρηση της συχνότητας της ασθένειας χρησιμοποιήθηκε η εξής μέθοδος: Σε αγρούς στον Παλαμά και στις Καρυές Φθιώτιδας με φυτά τομάτας (επιτραπέζιας ή βιομηχανικής) που παρουσίαζαν συμπτώματα προσβολής από φυτοπλάσματα μετρήθηκε ο αριθμός των ασθενών φυτών σε τρία τετράγωνα που το κάθε ένα περικλείει 100 φυτά, και η συχνότητα της ασθένειας εκφράστηκε ως επί τοις εκατό ποσοστό του συνόλου των φυτών.

3.3. Συλλογή και εκτροφή ημίπτερων εντόμων πιθανών φορέων φυτοπλάσμάτων

3.3.1. Συλλογή εντόμων στον αγρό

Συλλογή εντόμων - πιθανών φορέων (ημίπτερα) πραγματοποιήθηκε σε αγρούς με φυτά τομάτας που παρουσίαζαν συμπτώματα προσβολής από φυτοπλάσματα κατά την καλλιεργητική περίοδο 2006 (Πίνακας 6). Επίσης, δειγματοληψίες εντόμων πραγματοποιήθηκαν και από τους κ. Ε. Βέλλιο και κ. Φ. Λιολιοπούλου. Τα έντομα συλλέχθηκαν τις πρωινές ώρες στις καλλιέργειες, στους φυτοφράχτες των αγρών, και σε υπολείμματα καλλιεργειών γειτονικών αγρών με τη βοήθεια μιας απόχης σάρωσης με διάκενο δικτυού (mesh: αριθμός οπών / ίντσα) ίσο με 35. Η σάρωση των φυτών έγινε από κάτω προς τα πάνω. Ακολούθησε συλλογή των ημίπτερων εντόμων με ειδικούς αναροφητήρες (Εικόνα 5). Στη συνέχεια τα έντομα τοποθετήθηκαν σε φορητό ηλεκτρικό ψυγείο, στους 8-10 °C, και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για περαιτέρω χρήση.



Εικόνα 2. Φυτό τομάτας με έντονη βλαστομανία βραχέων και παχέων βλαστών και υπερμεγέθη σέπαλα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας "stolbur" (προσφορά Ε. Βέλλιου και Φ. Λιολιοπούλου)



Εικόνα 3. Σχηματισμός μεγάλων ανθοφόρων κωνοειδών οφθαλμών τομάτας που οφείλεται σε προσβολή από φυτοπλάσματα που προκαλούν την ασθένεια γιγαντοφθαλμία (προσφορά Ε. Βέλλιου και Φ. Λιολιοπούλου)



Εικόνα 4. Συστροφή και ιώδης μεσονεύριος μεταχρωματισμός φύλλων τομάτας (προσφορά Ε. Βέλλιου και Φ. Λιολιοπούλου)

Πίνακας 5. Δειγματοληψίες που διενεργήθηκαν κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2005 και 2006

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Κωδικός δειγματοληψίας (με λατινικούς χαρακτήρες)	Περιοχή / Νόμος
<i>Καλλιεργητική περίοδος 2005</i>		
31-07-2005	XII	Βρυσιά Φαρσάλων
02-08-2005	XIII	Λεβεντοχώρι Ηλείας
08-08-2005	XX	Παλαμάς Φθιώτιδας
08-08-2005	XIX	Ριζόμυλος Μαγνησίας
11-08-2005	XXII	Ψαχνά Ευβοίας
12-08-2005	XXIV	Μαντούδι Ευβοίας
12-08-2005	XXVII	Νεοχώρι Ευβοίας
<i>Καλλιεργητική περίοδος 2006</i>		
20-07-2006	XLII	Αύρα Φαρσάλων
27-07-2006	XI	Ορχομενός Βοιωτίας
27-07-2006	X	Κωπαΐδα Βοιωτίας
02-08-2006	XIII	Λεβεντοχώρι Ηλείας
02-08-2006	XV	Εφύρα Ηλείας
07-08-2006	LXIII	Παλαμάς Φθιώτιδας
08-08-2006	XXI	Ξυνιάδα Φθιώτιδας
10-10-2006	XLII	Αύρα Φαρσάλων

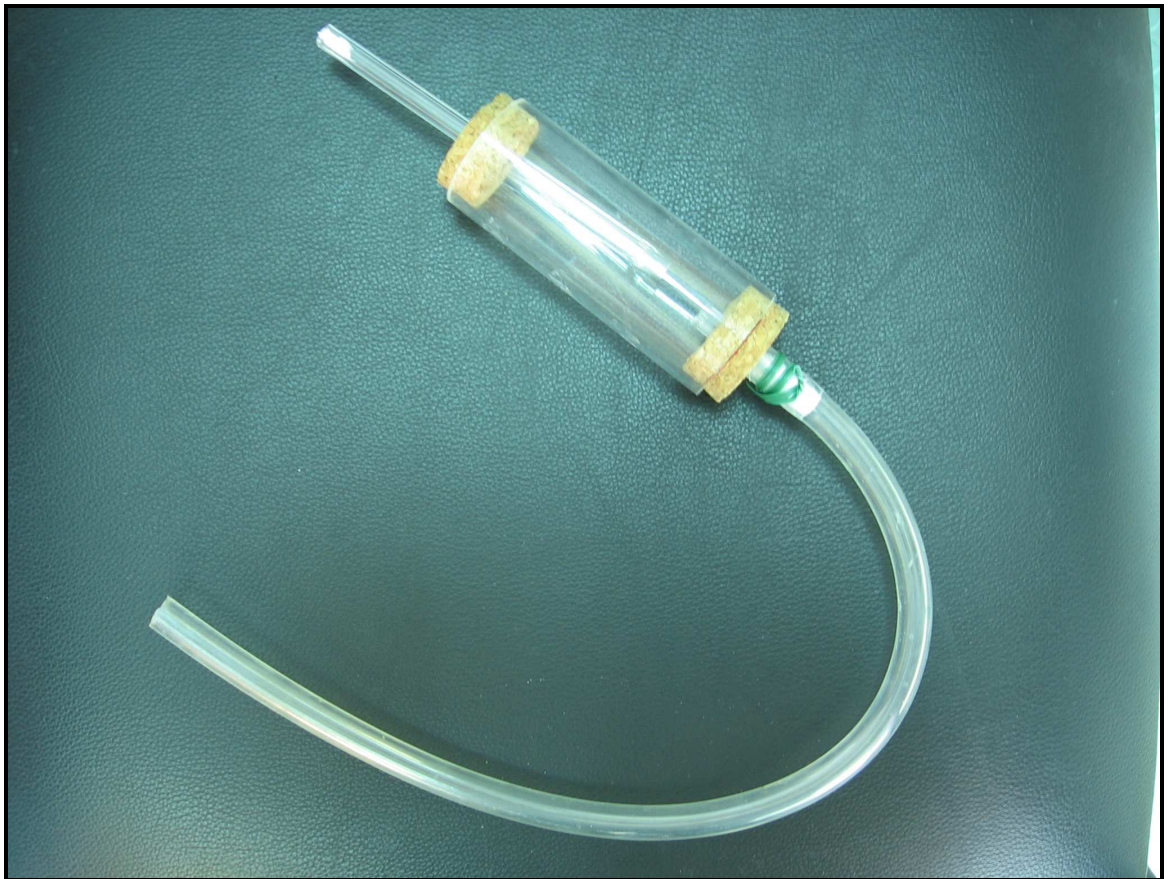
Πίνακας 6. Ημερομηνία, περιοχή και αγροί στους οποίους πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες εντόμων

Ημερομηνία συλλογής	Περιοχή συλλογής	Αγροί όπου έγιναν δειγματοληψίες
17-7-2006	Ριζόμυλος Μαγνησίας	2
7-8-2006	Παλαμάς Φθιώτιδας	1
1-10-2006	Παλαμάς Φθιώτιδας	1
5-10-2006	Παλαμάς Φθιώτιδας	1
10-10-2006	Παλαμάς Φθιώτιδας	1

3.3.2. Εκτροφή ημίπτερων εντόμων σε θρεπτικό διάλυμα

Για την εκτροφή των εντόμων στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκαν σωλήνες Eppendorf[®] χωρητικότητας 1,5 mL (Εικόνα 6), στους οποίους μεταφέρονταν τα έντομα και διατρέφονταν σε θρεπτικό διάλυμα που αποτελούνταν από διάλυμα 5% σακχαρόζης σε TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Η άνω επιφάνεια από το καπάκι των σωλήνων Eppendorf[®] χρωματίστηκε με κίτρινο μαρκαδόρο, ενώ 200 μ L θρεπτικού διαλύματος τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό κοίλωμα του καπακιού, το οποίο κλείστηκε με ταινία Parafilm. Το κάτω άκρο των σωλήνων κόπηκε και στη συνέχεια καλύφθηκε με βαμβάκι. Τα έντομα μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο, αναισθητοποιήθηκαν με τη χρήση CO₂ και τοποθετήθηκαν ατομικά στους ειδικά διαμορφωμένους μικροκλωβούς. Στη συνέχεια, οι μικροκλωβοί μεταφέρονταν σε κατάλληλα διαμορφωμένο χάρτινο κουτί, που στη μια πλευρά υπήρχαν δύο όμοιες λάμπες (TELCO, 220-240 V, 8 W, 50 Hz) ενώ κάθετα στον κύριο άξονα του κουτιού τοποθετήθηκε ένα διάτρητο φενιζόλ, στο οποίο διατηρούνταν οι μικροκλωβοί (Εικόνα 7). Στο χάρτινο κουτί οι μικροκλωβοί παρέμειναν σε οριζόντια θέση, με το καπάκι στραμμένο προς μία φωτεινή πηγή, και διατηρούνταν σε θερμοκρασία δωματίου (23-25 °C), για 48-72 h (Tanne *et al.*, 2001; Sabaté *et al.*, 2003).

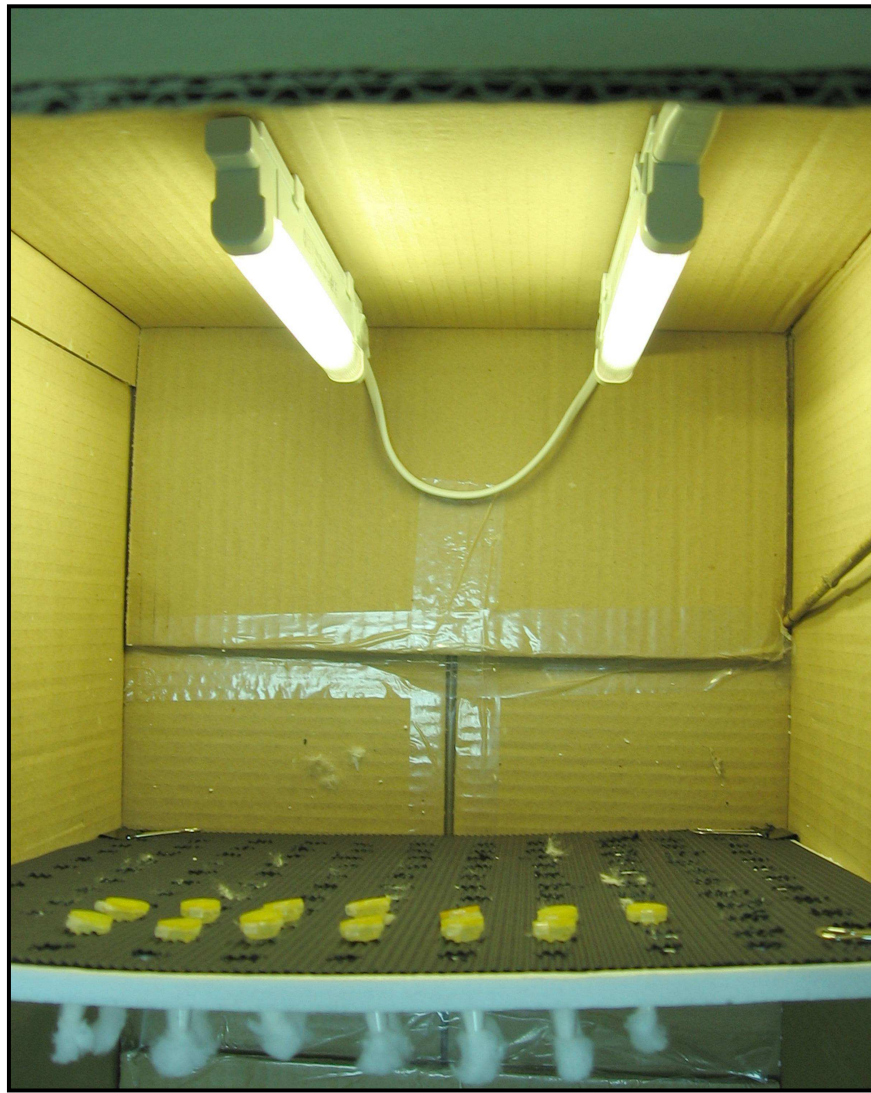
Μετά την πάροδο 72 h τα νεκρά έντομα συλλέγονταν, φωτογραφίζονταν, και στη συνέχεια αποθηκεύονταν στους -20 °C. Όσα έντομα ήταν ζωντανά παρέμειναν στους σωλήνες Eppendorf[®] και συνέχισαν να διατρέφονται με θρεπτικό διάλυμα, με σκοπό να αφήσουν τη μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα φυτοπλασματικών κυττάρων στο θρεπτικό διάλυμα. Το θρεπτικό διάλυμα των εντόμων που παρέμειναν ζωντανά αλλάχθηκε 1 φορά / μήνα μέχρι αυτά να πεθάνουν. Τέλος, το θρεπτικό διάλυμα των νεκρών και των ζωντανών εντόμων τοποθετούνταν σε σωλήνες Eppendorf[®] (1,5 mL) και αποθηκεύονταν στους -20 °C, για περαιτέρω χρήση.



Εικόνα 5. Αναροφητήρας που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή και μεταφορά των εντόμων στο εργαστήριο



Εικόνα 6. Σωλήνας Eppendorf® κατάλληλα διαμορφωμένος σε μικροκλωβό διατροφής



Εικόνα 7. Χάρτινο κουτί στο οποίο τοποθετούνταν μικροκλωβοί με ημίπτερα έντομα σε οριζόντια θέση προς το φως

3.4. Μοριακές τεχνικές

3.4.1. Απομόνωση ολικού DNA από φυτά τομάτας προσβεβλημένα με φυτοπλάσματα

Η απομόνωση του ολικού DNA φυτών τομάτας προσβεβλημένων με φυτοπλάσματα έγινε βάση των μεθόδων που περιγράφονται από τους Lee *et al.* (2001), Ahrens and Seemüller (1992), και Doyle and Doyle (n.d.)

Περίπου 1 g παγωμένου φυτικού ιστού (-80 °C) αλέστηκε σε προψυγμένο γουδί με τη βοήθεια υγρού αζώτου, μέχρι να αποκτήσει τη μορφή σκόνης. Τέσσερα mL ρυθμιστικού διαλύματος CTAB-1 (2% hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), 1,4 M NaCl, 0,2% 2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) που είχαν προθερμανθεί στους 60 °C για 30 min, προστέθηκαν στον αλεσμένο φυτικό ιστό, και το δείγμα θερμάνθηκε στους 60 °C για 30 min, με περιοδική ανακίνηση. Ακολούθησε καθαρισμός του δείγματος με μίγμα χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) (προσθήκη ίσου όγκου μίγματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), καλή ανάδευση ώστε το μίγμα να λάβει τη μορφή γαλακτώματος, φυγοκέντρηση στα 17900 x g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, και παραλαβή της υδατικής φάσης). Έπειτα, στην υδατική φάση προστέθηκε παγωμένη ισοπροπανόλη ίση με τα 2/3 του όγκου του δείγματος και μετά από φυγοκέντρηση στα 15300 x g για 5 min και απόρριψη της υδατικής φάσης το ίζημα πλύθηκε με 70% αιθυλική αλκοόλη (EtOH) (προσθήκη 1 mL EtOH, φυγοκέντρηση στα 15300 x g για 5 min, και απομάκρυνση της EtOH). Κατόπιν σύντομης παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστεί τελείως η EtOH, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 400 µL αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (sdH₂O). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε επώαση του δείγματος με 0,5 µg/mL RNase A (Marcherey) στους 37 °C για 30 min και, μετά το τέλος της πέψης, έγινε καθαρισμός του δείγματος με ίσο όγκο μίγματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), όπως περιγράφηκε

προηγούμενος. Ο καθαρισμός επαναλήφθηκε άλλη μια φορά και στη συνέχεια το DNA στο δείγμα κατακρημνίστηκε με προσθήκη $1/10$ όγκου 3 M οξικού νατρίου (NaAc) με pH 5,3 και 2,5 όγκων 100% παγωμένης EtOH, παραμονή στους -20°C για $1-1\frac{1}{2}$ h, και φυγοκέντρωση στα $17900 \times g$ για 10 min. Το ίζημα που προέκυψε πλύθηκε δύο φορές με 70% EtOH και μια φορά με 100% EtOH (όπως αναφέρθηκε παραπάνω), επαναδιαλύθηκε σε 400 μL sdH_2O , και το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -20°C .

Η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA υπολογίστηκε βάσει της απορρόφησης του δείγματος σε μήκος κύματος 260 και 280 nm στο φασματοφωτόμετρο. Απορρόφηση στα 260 nm ίση με τη μονάδα αντιστοιχεί σε 50 ng/ μL διπλής έλικας DNA. Λαμβάνοντας 5 μL από το δείγμα και προσθέτοντας 95 μL sdH_2O (αραίωση $1/20$ του δείγματος) μετρήθηκε η απορρόφηση (A_{260}) αυτού του υδατικού διαλύματος στο φασματοφωτόμετρο στα 260 nm. Οπότε η συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος, είναι: $C_{\text{υδ. δ/τος}} \text{ (ng/}\mu\text{L)} = 50 \times A_{260}$. Η συγκέντρωση του δείγματος δίνεται από τη σχέση: $C_{\text{δείγματος}} \text{ (ng/}\mu\text{L)} = 50 \times 20 \times A_{260} = 1000 \times A_{260}$. Η καθαρότητα του δείγματος προκύπτει από τον λόγο A_{260}/A_{280} , ενώ οι επιθυμητές τιμές καθαρότητας του DNA είναι μεταξύ 1,8 και 2,0 (Oxford University, 1999; Sambrook *et al.*, 1989).

3.4.2. Αύξηση της συγκέντρωσης των φυτοπλάσμάτων από ιστούς προσβεβλημένων φυτών τομάτας

Σε ορισμένες περιπτώσεις κρίθηκε σκόπιμο να αυξηθεί η συγκέντρωση του φυτοπλασματικού DNA (ως μέρος του ολικού DNA) με βάση το πρωτόκολλο των Lee *et al.* (2001), ώστε η PCR που θα ακολουθούσε να μη δώσει λανθασμένο αρνητικό αποτέλεσμα. Έτσι, έγινε προσπάθεια αύξησης της συγκέντρωσης των φυτοπλάσμάτων με απομόνωση τους από τους φυτικούς ιστούς σύμφωνα με την παρακάτω μέθοδο:

Περίπου 1,5 g φρέσκου φυτικού ιστού τομάτας και 8 mL ρυθμιστικού διαλύματος (2,17 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,41 g K_2HPO_4 , 10 g σακχαρόζη, 0,15 g BSA [fraction V], 2 g

PVP-10 [Polyvinylpyrrolidone] σε 100 mL, διήθηση με αποστειρωμένο φίλτρο Corning [26 mm Syringe Filter, 0,45 Micron, SFCA membrane], και προσθήκη 0,53 g L-ascorbic acid/100 mL διαλύματος, και ρύθμιση pH = 7,6 με 2 N NaOH πριν τη χρήση) αλέστηκαν σε προψυγμένο γουδί, και το μίγμα παρέμεινε για 20 min στον πάγο. Ακολούθησε καλό άλεσμα του ιστού, και προστέθηκαν άλλα 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος, μέχρις ότου το μίγμα να ομογενοποιηθεί. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 2000 x g για 5 min στους 4°C, και το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα 20000 x g για 30 min. Ακολούθησε απομάκρυνση του εκχυλίσματος και, κατόπιν σύντομης παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου, το ίζημα (τμήματα φυτικών κύτταρων τομάτας με φυτοπλασματικά κύτταρα) επαναδιαλύθηκε σε 200 μL θρεπτικού διαλύματος (Lee *et al.*, 2001).

3.4.3. Απομόνωση ολικού DNA από ημίπτερα έντομα

Για την απομόνωση του ολικού DNA από ημίπτερα έντομα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.1 με τις εξής τροποποιήσεις:

Κάθε δείγμα αποτελούνταν από πέντε έντομα μικρότερου μεγέθους ή τέσσερα μεγαλύτερου μεγέθους με παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά της ίδιας δειγματοληψίας. Στο δείγμα προστέθηκε 900 μL ή 600 μL ρυθμιστικού διαλύματος CTAB-1, αντίστοιχα, και μετά από επώαση στους 60 °C για 30 min και καθαρισμό με μίγμα χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) προστέθηκε στην υδατική φάση παγωμένη ισοπροπανόλη ίση με τα 2/3 του όγκου του δείγματος, και το μίγμα διατηρήθηκε στους -20 °C για 12-16 h. Μετά την πλύση με 70% EtOH, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 30 μL sdH_2O , ακολούθησε επώαση με 1,7 μg/mL RNase A στους 37 °C για 30 min, και καθαρισμός με ίσο όγκο μίγματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Μετά την κατακρήμνιση του ιζήματος με ανάμιξη με $1/10$ όγκου 3 M NaAc (pH 5,3) και 2,5 όγκους 100% παγωμένη EtOH, και παραμονή στους -20 °C για

1-1¹/₂ h, ακολούθησε πλύση μία φορά με 70% EtOH, και επαναδιάλυση σε 30 μL sdiH₂O.

3.4.4. Δοκιμές απομόνωσης DNA από θρεπτικό διάλυμα

Αρχικά σε όλα τα δείγματα θρεπτικού διαλύματος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 12000 x g για 15 min. Μετά την φυγοκέντρηση του θρεπτικού διαλύματος αναμένονταν η παρουσία ιζήματος (κύτταρα φυτοπλασμάτων), και στη συνέχεια θα ακολουθούσε απομόνωση του ολικού DNA από το θρεπτικό διάλυμα (Tanne *et al.*, 2001). Επειδή, κάτι τέτοιο δεν κατέστη εφικτό πραγματοποιήθηκαν δοκιμές απομόνωσης DNA από το θρεπτικό διάλυμα χρησιμοποιώντας τις μεθόδους που περιγράφονται παρακάτω.

Μέθοδος Α'

Μίγμα 200 μL θρεπτικού διαλύματος, στο οποίο προστέθηκαν 20 μL τμημάτων φυτικών κύτταρων τομάτας με φυτοπλασματικά κύτταρα ($C_{\text{δειγμ.}} = 48,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$) ή υγιούς τομάτας ($C_{\text{δειγμ.}} = 61,1 \text{ ng}/\mu\text{L}$), και 900 μL ρυθμιστικού διαλύματος TNE (1,1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 μL 5 M Guanidine Hydrochloride, 100 μg K-Proteinase [HT Biotechnology LTD]) θερμάνθηκαν στους 58 °C για 2 h (Sabaté *et al.*, 2003). Ακολούθησε καθαρισμός του DNA με ίσο όγκο μίγματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), και πέψη της υδατικής φάσης με 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A στους 37 °C για 30 min. Ακολούθησε και δεύτερος καθαρισμός του δείγματος με ίσο όγκο μίγματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), και το DNA κατακρημνίστηκε με ανάμιξη με ¹/₁₀ όγκου 3M NaAc (pH 5,3) και 2,5 όγκους 100% παγωμένη EtOH. Στη συνέχεια, το ίζημα πλύθηκε με 70% και με 100% EtOH, επαναδιαλύθηκε σε 10-15 μL sdiH₂O, και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Η ποσότητα και η

καθαρότητα του ολικού DNA υπολογίστηκε όπως στην παράγραφο 2.3.1 (Lee *et al.*, 2001; Ahrens and Seemüller, 1992; Sabaté *et al.*, 2003; Doyle and Doyle, n.d.).

Η διαδικασία επαναλήφθηκε προσθέτοντας 0,2 ή 0,5 ή 2 μL DNA ασθενούς φυτού τομάτας με συμπτώματα της ασθένειας γιγαντοφθαλμία ($C_{\text{δειγμ.}} = 446,3 \text{ ng}/\mu\text{L}$) σε 200 μL θρεπτικού διαλύματος, μιας και η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε προηγουμένως ήταν μικρή.

Μέθοδος Β'

Η μέθοδος Β' βασίστηκε στο πρωτόκολλο που δίνεται από το Ινστιτούτο για την Υγεία και την Προστασία του Καταναλωτή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, και προτείνεται για την απομόνωση DNA από φυτικούς ιστούς πλούσιους σε σάκχαρα (ρίζα ζαχαρότευτλων). Μίγμα 200 μL θρεπτικού διαλύματος, στο οποίο προστέθηκαν 20 μL DNA υγιούς φυτού τομάτας ($C_{\text{δειγμ.}} = 140,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος CTAB-2 (2% CTAB, 1,4M NaCl, 0,015M EDTA, 0,1M Tris-HCl, pH 8,0), 0,02 mg/mL K-Proteinase και 0,25 mg/mL RNase επώστηκαν στους 60 °C για 12-16 h (KWS SAAT AG and Monsanto Company, 2006). Μετά το τέλος της επώασης, το μίγμα παρέμεινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για περίπου 15 min, και ακολούθησε προσθήκη 0,5 mL μίγματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Μετά από καλή ανάδευση για περίπου 5 min με το χέρι, ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 10000 x g για 5 min. Στην υδατική φάση προστέθηκαν δύο όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος CTAB-3 (0,5% CTAB, 40 mM NaCl) για την κατακρήμνιση του ολικού DNA. Ακολούθησε παραμονή του δείγματος για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση στα 10000 x g για 20 min, και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 15 μL sdiH_2O και αποθηκεύτηκε στους -20 °C (KWS SAAT AG and Monsanto Company, 2006).

3.4.5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Τα βασικά συστατικά της PCR ήταν: 10 μL 5x PCR buffer (Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase Buffer), 1 μL 2 mM dNTPs (New England Biolabs, NEB), 3 μL 25 mM MgCl_2 , 1 μL 20 pmol/ μL από κάθε εκκινητή, 0,3 μL Taq πολυμεράση 5 u/ μL (Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase), 1 μL DNA, και sdiH_2O μέχρι τελικού όγκου 50 μL σε μικροσωλήνες PCR όγκου 0,2 mL (Greiner bio-one).

Οι συνθήκες της PCR όταν χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών P1/P7 ή fStol/rStol (Sigma Aldrich desalted) ήταν οι εξής: 94°C για 2 min για τον πρώτο κύκλο, και 94°C για 10 min, 50°C για 20 sec, 65°C για 20 sec, 72°C για 2 min για 25 κύκλους. Οι αλληλουχίες των εκκινητών δίνονται στον Πίνακα 1.

3.4.6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αгарόζης

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1,05% σε διάλυμα 1x TBE (5,4 g Tris base, 2,75 g βορικού οξέος, 0,5 M EDTA, pH 8,0) με τη χρήση συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (horizontal electrophoresis mini unit, Sigma - Aldrich). Στα δείγματα (5,0 μL από κάθε προϊόν της PCR) προστέθηκε πριν την ηλεκτροφόρηση 1 μL 10x Loading buffer (Takara). Ως δείκτης μοριακού βάρους τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε 1kb DNA Ladder (NEB, New England Biolabs) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 1x TBE, για 40 min με σταθερή τάση 100 V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτική εμβαπτίστηκε σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθυδίου (Sigma) (1,6 mg/mL) για 15 min, και μετά από πλύσιμο με τρεχούμενο νερό, ακολούθησε έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (312 nm), οπότε τα τμήματα DNA έγιναν ορατά.

3.5. Βιοπληροφορική

Προκειμένου να βρεθεί η αλληλουχία βάσεων του γονιδίου 16S rDNA, της περιοχής ITS 16/23S rDNA, και του γονιδίου 23S rDNA χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων EMBL (European Molecular Biology Laboratory) (<http://www.ebi.ac.uk/embl>). Στη συνέχεια, για την εύρεση των πιθανών περιοχών υβριδισμού των εκκινητών του Πίνακα 1 στο τμήμα του γενώματος 16S rDNA, ITS 16/23S rDNA, και 23S rDNA του φυτοπλάσματος όπου είναι υπεύθυνο για την ασθένεια "stolbur" χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BL2SEQ (πακέτο προγραμμάτων SDSC (San Diego Supercomputer Center) Biology Workbench, <http://workbench.sdsc.edu>). Με τη βοήθεια αυτού του προγράμματος έγινε σύγκριση των αλληλουχιών βάσεων των εκκινητών του Πίνακα 1 με αλληλουχίες βάσεων γενωμάτων φυτοπλάσμάτων της ομάδας "stolbur".

3.6. Δοκιμές παρασιτισμού φυτών από κουσκούτα

3.6.1. Βλάστηση σπόρων κουσκούτας

Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι κουσκούτας που συλλέχθηκαν κατά την καλλιεργητική περίοδο 2005 από φυτά κουσκούτας που παρασιτούσαν σε τομάτα (Ορχομενός Βοιωτίας, συλλογή Α), και σε βαλλωτή (*Ballota* L.) (Παλαμάς Καρδίτσας, συλλογή Β). Η συλλογή των σπόρων κουσκούτας πραγματοποιήθηκε από τον κ. Ε. Βέλλιο και την κ. Φ. Λιολιοπούλου.

Η διακοπή του λήθαργου των σπόρων της κουσκούτας που οφείλεται στο σκληρό εξωτερικό περίβλημα (Benvenouti *et al.*, 2005; Προσωπική επικοινωνία κ. Ε. Βέλλιου με κ. Ε. Πασπάτη - Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο) έγινε με τη χρήση θεικού οξέος ως εξής:

Περίπου 20 σπόροι κουσκούτας από κάθε συλλογή τοποθετήθηκαν σε σωλήνες Eppendorf® των 1,5 mL με 0,5 mL πυκνού θειικού οξέος (καθαρότητας 95-97%), και παρέμειναν για 15 min με περιοδική ισχυρή ανακίνηση (30 sec). Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 1700 x g για 2 min, και μετά την αφαίρεση του θειικού οξέος (Εικόνα 8), οι σπόροι πλύθηκαν με 0,5 mL σdH₂O για περίπου 1 min με συνεχή ισχυρή ανακίνηση, και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά τριβλία Petri με βρεγμένο διηθητικό χαρτί στον πάτο (Εικόνα 9). Τα τριβλία διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 30 °C, στο σκοτάδι, έως ότου βλαστήσουν και το μήκος του βλαστιδίου της κουσκούτας φτάσει τα 0,5 – 4,0 cm (Benvenouti *et al.*, 2005; Raine *et al.*, 1986; Προσωπική επικοινωνία κ. Ε. Βέλλιου με κ. Ε. Πασπάτη - Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο).

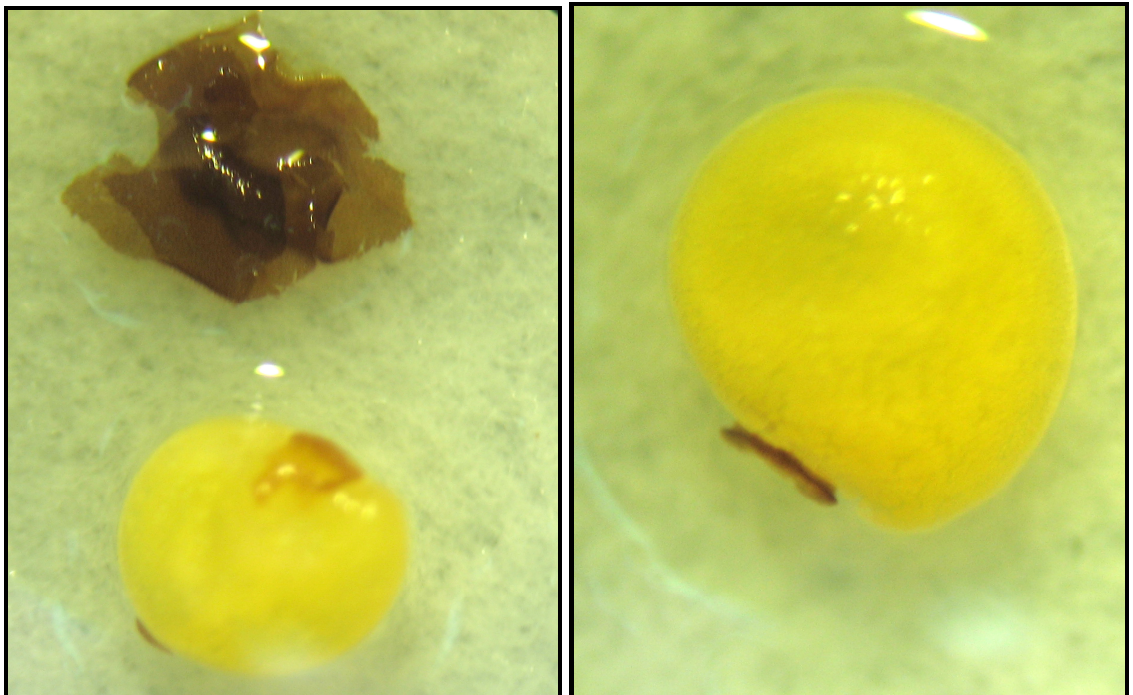
3.6.2. Δοκιμές παρασιτισμού της κουσκούτας σε υγιή φυτά τομάτας και βίνκας

Φυτά τομάτας, ποικιλίας Ace (Agrena) και υβριδίου Meteor F1 (Clause) (στο στάδιο των κοτυληδόνων ή των 5 πραγματικών φύλλων), καθώς και βίνκας (*Vinca rosea nana*) (στο στάδιο των κοτυληδόνων ή ηλικίας 30 ημερών), χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές παρασιτισμού. Βλαστίδια κουσκούτας από τις συλλογές A ή B, με μήκος νήματος 0,5 cm, τοποθετήθηκαν στο έδαφος, ενώ παράλληλα στο βλαστό τοποθετήθηκαν βλαστίδια με μήκος 0,5 – 4,0 cm (Πίνακας 7).

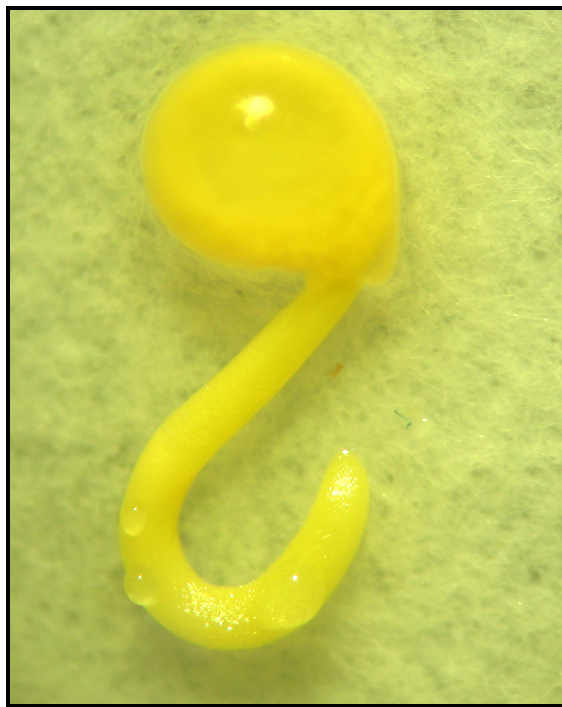
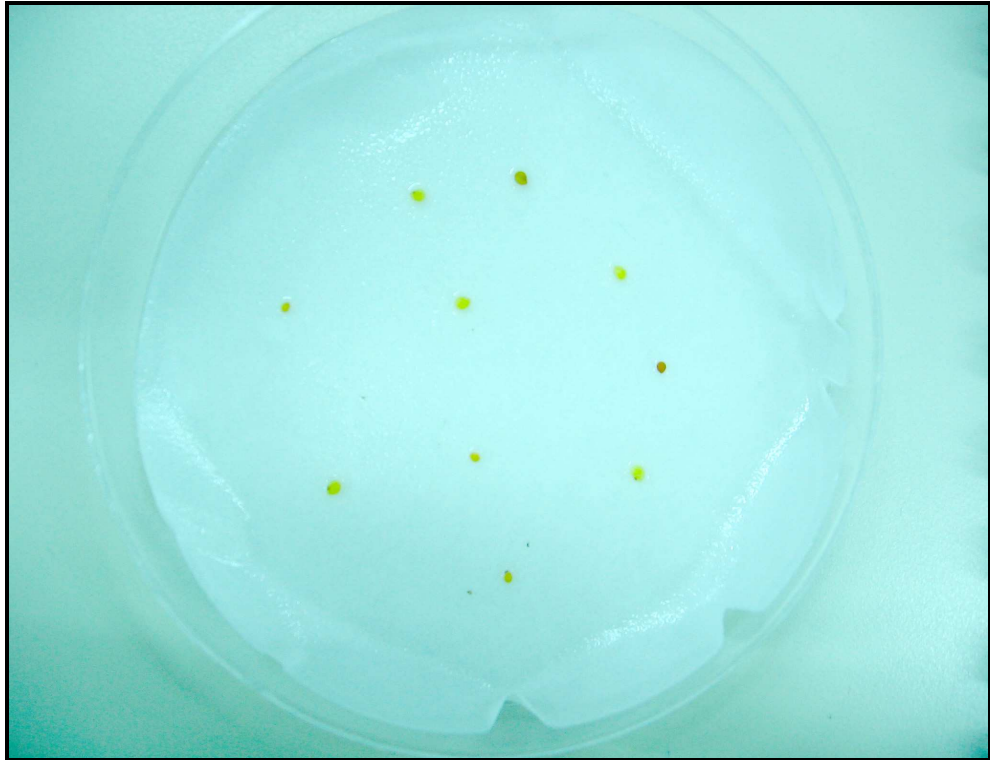
Στα φυτά μεγαλύτερης ηλικίας περισσότερα του ενός βλαστιδίου κουσκούτας τοποθετήθηκαν στο βλαστό (πάνω από τις κοτυληδόνες) με περιέλιξη του νήματος με φορά αντίθετη από τη φορά των δεικτών του ρολογιού, ενώ στο έδαφος τοποθετήθηκε 1 βλαστίδιο σε απόσταση 1,0 cm από το φυτό και βάθος 0,5 cm. Στα φυτά μικρότερης ηλικίας τοποθετήθηκε 1 βλαστίδιο κουσκούτας στο βλαστό (κάτω από τις κοτυληδόνες) και 1 βλαστίδιο στο έδαφος.

Όλα τα φυτά κλείστηκαν σε πλαστικές σακούλες που είχαν διαβρεχτεί, ώστε να δημιουργηθεί κορεσμένη σε υδρατμούς ατμόσφαιρα (Εικόνα 10). Έπειτα τοποθετήθηκαν

σε συνθήκες πρόσθετου φωτισμού (λάμπες Flora – Osram, 16h φώς / 8h σκοτάδι), σε θερμοκρασία δωματίου, και οι σακούλες ανοίγονταν κάθε 3-4 ημέρες για περίπου 2 ώρες προκειμένου τα φυτά να αερίζονται. Σε όλες τις περιπτώσεις μετά από περίπου 10 ημέρες οι σακούλες απομακρύνονταν τελείως από τα φυτά (Benvenouti *et al.*, 2005; Raine *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 2000).



Εικόνα 8. Σπόροι κουσκούτας πριν και μετά την απομάκρυνση του σκληρού περιβλήματος με τη χρήση θειικού οξέος



Εικόνα 9. Βλάστηση σπόρων κουσκούτας σε πλαστικό τριβλίο Petri με βρεγμένο διηθητικό χαρτί, και έκπτυξη του βλαστιδίου κουσκούτας

Πίνακας 7. Αριθμός φυτών και βλαστιδίων κουσκούτας που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε συλλογή στις δοκιμές παρασιτισμού υγιών φυτών τομάτας και βίνκας από κουσκούτα

	Φυτά τομάτας ποικιλίας Ace	Φυτά τομάτας υβριδίου Meteor F1	Φυτά βίνκας
Αριθμός φυτών που χρησιμοποιήθηκαν (επαναλήψεις)	3	4	3
Βλαστίδια κουσκούτας στο έδαφος και στο βλαστό / φυτό	1 βλαστίδιο στο έδαφος και 1 βλαστίδιο στο βλαστό / φυτό	1 βλαστίδιο στο έδαφος και 3-6 βλαστίδια στο βλαστό / φυτό	1 βλαστίδιο στο βλαστό / φυτό



Εικόνα 10. Φυτά τομάτας (στο στάδιο των 5 πραγματικών φύλλων), στα οποία έχουν τοποθετηθεί βλαστίδια κουσκούτας. Τα φυτά κλείστηκαν με πλαστικές σακούλες που είχαν διαβρεχτεί ώστε να δημιουργηθεί κορεσμένη ατμόσφαιρα

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Συλλογή φυτών τομάτας προσβεβλημένων από φυτοπλάσματα

4.1.1. Μέτρηση της συχνότητας της ασθένειας στον αγρό

Η μέτρηση της συχνότητας της ασθένειας πραγματοποιήθηκε σε αγρούς στον Παλαμά και στις Καρυές Φθιώτιδας με φυτά τομάτας που παρουσίαζαν συμπτώματα προσβολής από φυτοπλάσματα. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι στον Παλαμά Φθιώτιδας το ποσοστό των προσβεβλημένων φυτών άγγιζε το 12,5%, ενώ στις Καρυές Φθιώτιδας το 50-60%.

4.2. Συλλογή και εκτροφή ημίπτερων εντόμων πιθανών φορέων φυτοπλάσμάτων

4.2.1. Συλλογή ημίπτερων εντόμων στον αγρό

Δειγματοληψίες εντόμων πραγματοποιήθηκαν τις πρωινές ώρες στις καλλιέργειες, και στους φυτοφράχτες αγρών με φυτά τομάτας με συμπτώματα προσβολής από φυτοπλάσματα, καθώς και στους γειτονικούς αγρούς με στελέχη σιτηρών μετά το θερισμό. Στις δειγματοληψίες που έγιναν στις καλλιέργειες, δεν βρέθηκαν ημίπτερα έντομα, σε αντίθεση με τους φυτοφράχτες των αγρών και τα υπολείμματα καλλιεργειών σε γειτονικούς αγρούς. Στους φυτοφράχτες των αγρών κυριαρχούσαν ζιζάνια, τα οποία συλλέχθηκαν, μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, και στη συνέχεια αποξηράθηκαν. Η αναγνώριση των ζιζανίων, στα οποία τρέφονταν τα συλλεχθέντα έντομα, θα πραγματοποιηθεί όταν τα δείγματα εντόμων δώσουν θετική αντίδραση PCR με το ζεύγος γενικευμένων εκκινητών P1/P7.

4.2.2. Ομαδοποίηση ημίπτερων εντόμων

Σε όλες τις δειγματοληψίες τα περισσότερα από τα έντομα που συλλέγονταν ήταν γένους θηλυκού, ενώ συλλέγονταν και προνύμφες σε μικρούς αριθμούς. Τα έντομα ομαδοποιούνταν με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (πιθανόν να ανήκουν στο ίδιο γένος), και στη συνέχεια εξετάζονταν για την παρουσία φυτοπλασματικού DNA. Αν και ο αριθμός των ημίπτερων εντόμων που συλλέχθηκαν ήταν 24-67 άτομα ανά δειγματοληψία, για την απομόνωση φυτοπλασματικού DNA από τα έντομα χρησιμοποιήθηκαν ομάδες εντόμων που αποτελούνταν από τουλάχιστον έξι άτομα, διότι τουλάχιστον τέσσερα άτομα ήταν απαραίτητα για την απομόνωση του DNA, και δύο άτομα της ομάδας (ένα αρσενικό και ένα θηλυκό άτομο) θα χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για τον προσδιορισμό του γένους, στο οποίο ανήκουν (ομάδες με αριθμό ατόμων λιγότερα από έξι παρελήφθησαν). Από την ομαδοποίηση προέκυψαν 5 ομάδες και 14 υποομάδες των τεσσάρων ή πέντε ατόμων (Οικογένεια: Cicadellidae) προκειμένου να εξακριβωθεί η παρουσία φυτοπλάσμάτων (Εικόνες 11-15). Ο προσδιορισμός της οικογένειας των ημίπτερων εντόμων έγινε με κλείδες (Chinery, 1993; Dietrich, 2005). Οι δειγματοληψίες, καθώς και ο αριθμός ατόμων ανά ομάδα σε κάθε δειγματοληψία που χρησιμοποιήθηκαν για PCR φαίνεται στον Πίνακα 8.

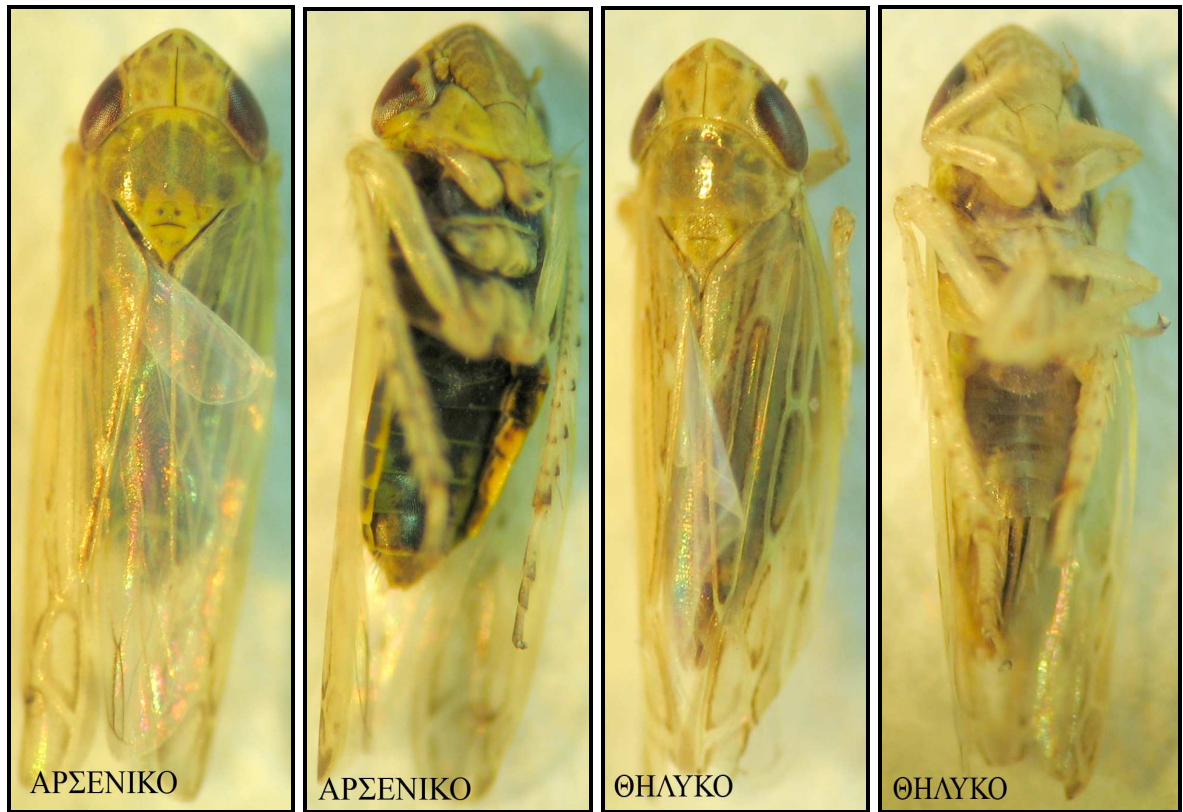
4.3. Μοριακές τεχνικές

4.3.1. Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών P1/P7 ή fStol/rStol από προσβεβλημένα φυτά τομάτας με φυτοπλάσματα

Από τα δείγματα που συλλέχθηκαν έγινε απομόνωση του DNA ώστε να ακολουθήσουν αντιδράσεις PCR. Η ποσότητα του DNA των δειγμάτων κυμαίνονταν από 100 έως 1200 ng/μL με καθαρότητα $1,8 < A_{260}/A_{280} < 2,0$.

Πίνακας 8. Δειγματοληψίες για τη συλλογή ημίπτερων εντόμων, και ομαδοποίηση των εντόμων ανά δειγματοληψία που χρησιμοποιήθηκαν για PCR

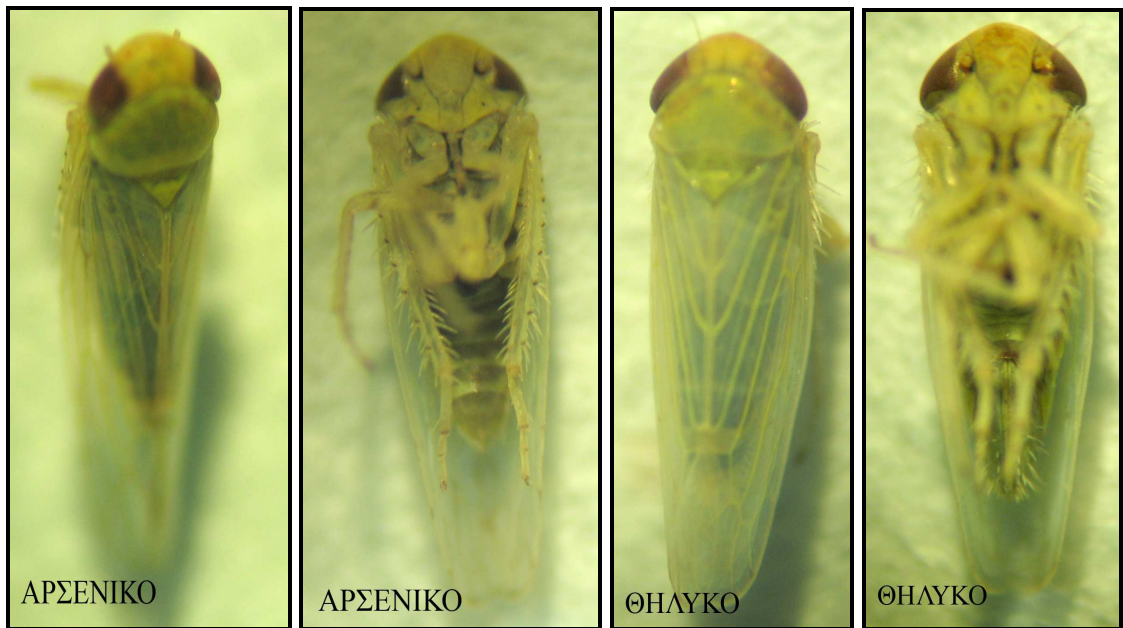
Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Ομάδες	Υποομάδες	Θηλυκά άτομα	Αρσενικά άτομα	Σύνολο ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν για PCR	Αριθμός ατόμων για αναγνώριση	
							Θηλυκά άτομα	Αρσενικά άτομα
Ριζόμυλος Μαγνησίας (αγρός Α)	17-7-2006	A	1	2	2	4	1	1
Ριζόμυλος Μαγνησίας (αγρός Β)	17-7-2006	A	1	3	2	5	2	2
			2	2	3	5		
		B	1	5	-	5	2	-
Παλαμάς Φθιώτιδας	7-8-2006	Γ	1	2	3	5	2	2
Παλαμάς Φθιώτιδας	1-10-2006	Γ	1	2	2	4	2	2
			2	-	5	5		
			3	-	5	5		
		Δ	1	3	2	5	1	2
Παλαμάς Φθιώτιδας	5-10-2006	A	1	3	2	5	1	2
			2	2	3	5		
Παλαμάς Φθιώτιδας	10-10-2006	E	1	1	3	4	1	1
			2	3	1	4		
		Δ	1	2	3	5	1	2



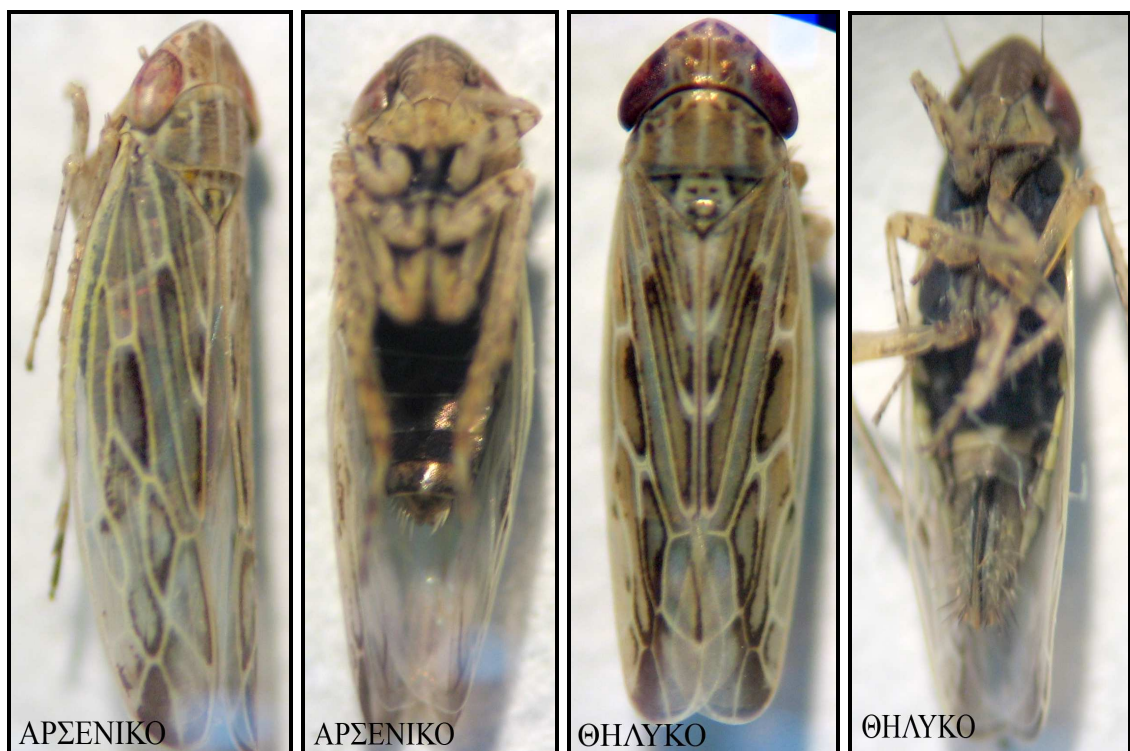
Εικόνα 11. Αρσενικά και θηλυκά άτομα της ομάδας Α (Οικογένεια: Cicadellidae)



Εικόνα 12. Θηλυκά άτομα της ομάδας Β (Οικογένεια: Cicadellidae)



Εικόνα 13. Αρσενικά και θηλυκά άτομα της ομάδας Γ (Οικογένεια: Cicadellidae)



Εικόνα 14. Αρσενικά και θηλυκά άτομα της ομάδας Δ (Οικογένεια: Cicadellidae)

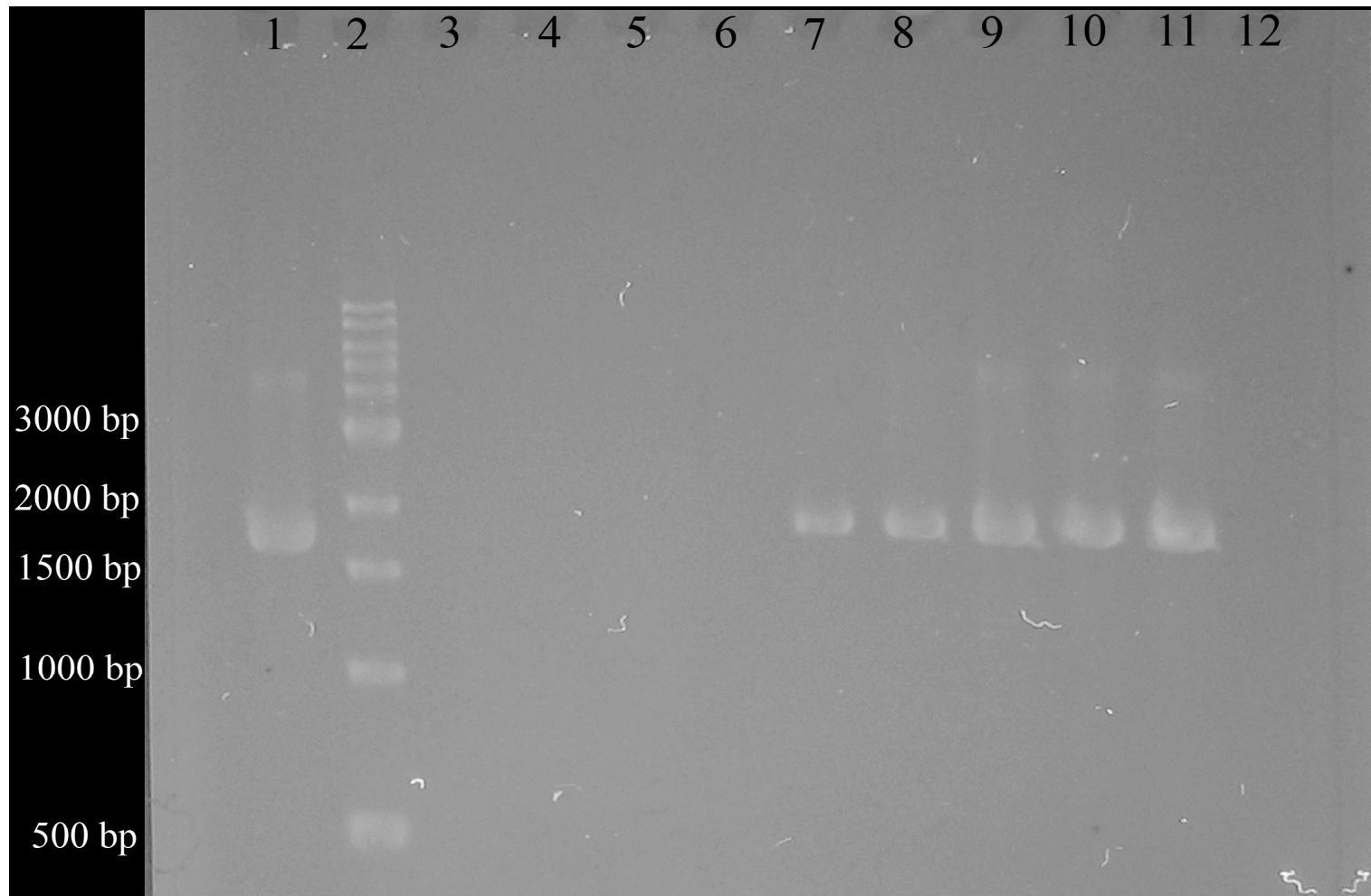


Εικόνα 15. Αρσενικά και θηλυκά άτομα της ομάδας Ε (Οικογένεια: Cicadellidae)

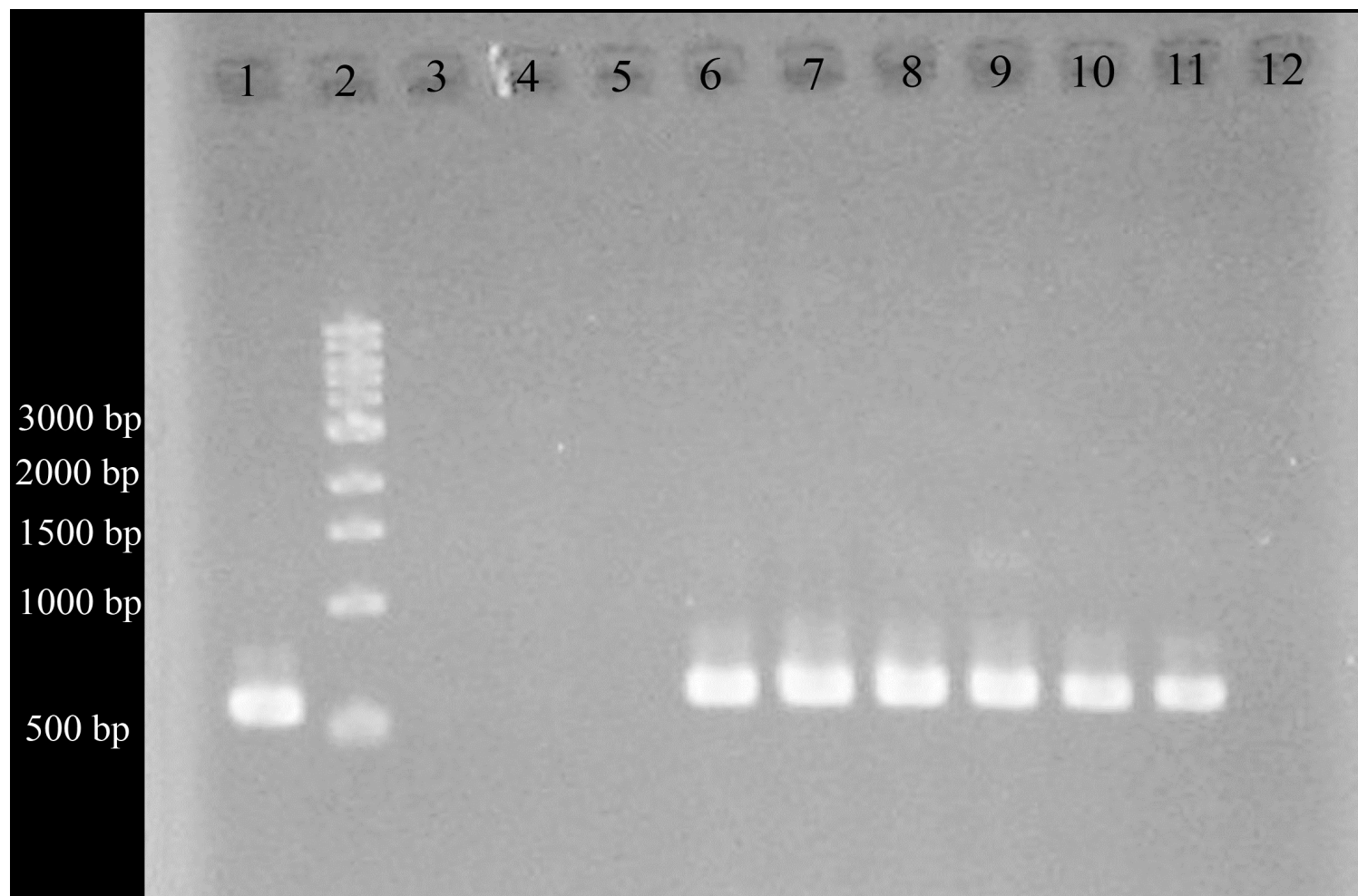
Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR με τη χρήση των γενικευμένων εκκινητών P1/P7 προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία φυτοπλασματικού DNA στα δείγματα. Από τα 31 δείγματα φυτών τομάτας που εξετάστηκαν, στα 28 διαπιστώθηκε η παρουσία φυτοπλάσματος, με τη χρήση των γενικευμένων εκκινητών P1/P7, όπου το προϊόν είχε το αναμενόμενο μέγεθος (Εικόνα 16). Δηλαδή φυτοπλασματικό DNA βρέθηκε στο 90,3% των δειγμάτων. Η απουσία φυτοπλάσματος σε 3 δείγματα πιθανόν να οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα φυτοπλασματικών κυττάρων στον ηθμό (μικρότερη της ευαισθησίας της PCR), μιας και τα φυτά τομάτας που εξετάστηκαν είχαν τυπικά συμπτώματα των ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπλάσματα.

Όσα δείγματα έδωσαν θετική αντίδραση PCR P1/P7, ακολούθησε μια δεύτερη PCR χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές fStol/rStol για την διαπίστωση της παρουσίας φυτοπλάσματος που ανήκουν στην ομάδα XII (Stolbur group). Με τη χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών fStol/rStol, επιβεβαιώθηκε η παρουσία φυτοπλάσματος που ανήκουν στην ομάδα XII (Stolbur group), μιας και το προϊόν της PCR είχε μέγεθος 570 bp (Εικόνα 17). Επίσης, σε δείγματα που παρουσίαζαν συμπτώματα της ασθένειας γιγαντοφθαλμία, ιώδη φύλλα ή συμπτώματα που δεν κατατάσσονται σε καμία κατηγορία ανιχνεύθηκε φυτόπλασμα της ομάδας XII - Stolbur group (Πίνακας 9).

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR που περιγράφονται, εκτός από τα προς ανάλυση δείγματα, χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας (DNA από υγιές φυτό τομάτας), ένας δεύτερος αρνητικός μάρτυρας (χωρίς προσθήκη DNA), και ένας θετικός μάρτυρας (DNA από ασθενές φυτό με τυπικά συμπτώματα "stolbur"). Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες στα 1800 bp και 570 bp στην πηκτική αгарόζης μετά τη χρώση, σε αντίθεση με τον θετικό μάρτυρα που αποκαλύφθηκαν οι αναμενόμενες ζώνες στην πηκτική.



Εικόνα 16. Διαχωρισμός ενισχυμένων τμημάτων DNA μετά από PCR με χρήση των γενικευμένων εκκινητών P1/P7 σε δείγματα προσβεβλημένων φυτών τομάτας με την τεχνική της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Σειρά προϊόντων της PCR στην πηκτή αγαρόζης 1: θετικός μάρτυρας, 2: Ladder 1 kb, 3: κενή θέση, 4: αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA, 5: αρνητικός μάρτυρας από υγιές φυτό, 6: κενή θέση, 7: LXIII-8388, 8: XIX-5907, 9: XII-5599, 10: XXII-6132, 11: XLII-7455, 12: κενή θέση (αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR: 1800 bp)



Εικόνα 17. Διαχωρισμός ενισχυμένων τμημάτων DNA μετά από PCR με χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών fStol/rStol σε δείγματα προσβεβλημένων φυτών τομάτας με την τεχνική της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Σειρά προϊόντων της PCR στην πηκτή αγαρόζης 1: θετικός μάρτυρας, 2: Ladder 1 kb, 3: αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA, 4: αρνητικός μάρτυρας από υγιές φυτό, 5: κενή θέση, 6: XLII-7455 7: XLII-7425, 8: XLII-7417, 9: XXI-5984, 10: X-5712, 11: XXII-6132, 12: κενή θέση (αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR: 570 bp)

Πίνακας 9. Δείγματα ασθενών φυτών τομάτας με συμπτώματα φυτοπλασματώσεως στα οποία διαπιστώθηκε η παρουσία / απουσία φυτοπλασμάτων

Κωδικός δειγματοληψίας (με λατινικούς χαρακτήρες)	Κωδικός δείγματος	Τύπος συμπτωμάτων	Προϊόν της PCR με εκκινητές P1/P7	Προϊόν της PCR με εκκινητές fStol/rStol
<i>Καλλιεργητική περίοδος 2005</i>				
XII	5599	Γιγαντοφαλμία	√	√
XIII	5627	"stolbur"	√	√
XIII	5623	"stolbur"	√	√
XX	5936	"stolbur"	√	√
XX	5943	Γιγαντοφαλμία	√	√
XIX	5896	"stolbur"	√	√
XIX	5907	Γιγαντοφαλμία	√	√
XIX	5906	Ιώδης μεταχρωματισμός φύλλων	√	√
XIX	5917	Ιώδης μεταχρωματισμός φύλλων	-	-
XXII	6091	Γιγαντοφαλμία	√	√
XXII	6071	"stolbur"	√	√
XXII	6082	Γιγαντοφαλμία	√	√
XXII	6106	Γιγαντοφαλμία	√	√
XXII	6132	Γιγαντοφαλμία	√	√
XXIV	6270	"stolbur"	√	√
XXIV	6214	"stolbur"	√	√
XXVII	6347	Γιγαντοφαλμία	√	√
XXIV	6202	Γιγαντοφαλμία	√	√
XXIV	6210	Γιγαντοφαλμία	√	√
XXIV	6212	Ιώδης μεταχρωματισμός φύλλων	-	-
<i>Καλλιεργητική περίοδος 2006</i>				
XLII	7425	Γιγαντοφαλμία	√	√
XLII	7417	Γιγαντοφαλμία	√	√
XI	5512	Συμπτώματα που δεν κατατάσσονται στις προηγούμενες κατηγορίες	√	√
X	5441	"stolbur"	√	√
XIII	5622	Συμπτώματα που δεν κατατάσσονται στις προηγούμενες κατηγορίες	√	√
XV	5712	Γιγαντοφαλμία	√	√
XV	5720	Συμπτώματα που δεν κατατάσσονται στις προηγούμενες κατηγορίες	√	√
LXIII	8388	Γιγαντοφαλμία	√	√
XXI	5998	"stolbur"	-	-
XXI	5984	Γιγαντοφαλμία	√	√
XLII	7455	Γιγαντοφαλμία	√	√

4.3.2. Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών P1/P7 σε ημίπτερα έντομα

Οι 14 υποομάδες εντόμων που προέκυψαν εξετάστηκαν ως προς την παρουσία φυτοπλασματικού DNA. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι σε καμία ομάδα εντόμων δεν διαπιστώθηκε η παρουσία φυτοπλάσματος, μιας και δεν διακρίνονται ζώνες στα 1800 bp στην πηκτική αγαρόζης μετά την χρώση. Επιπλέον, στους δύο αρνητικούς μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν (χωρίς προσθήκη DNA και DNA από υγιές φυτό τομάτας) δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες, ενώ στο θετικό μάρτυρα (DNA από ασθενές φυτό με τυπικά συμπτώματα "stolbur") αποκαλύφθηκε ζώνη στα 1800 bp (Εικόνα 18).

4.3.3. Αξιολόγηση δοκιμών απομόνωσης DNA από το θρεπτικό διάλυμα

Καταρχήν, πριν την εφαρμογή των μεθόδων που προαναφέρθηκαν (παράγραφος 2.3.4) για τις δοκιμές απομόνωσης του DNA, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του θρεπτικού διαλύματος σύμφωνα με τους Tanne *et al.* (2001). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν ανιχνεύθηκε ίζημα (φυτοπλασματικά κύτταρα) μετά την φυγοκέντρηση του θρεπτικού διαλύματος. Πιθανόν η απουσία ιζήματος να οφείλεται στην απουσία φυτοπλάσματος στο θρεπτικό διάλυμα, ή στην μικρή ποσότητα φυτοπλασματικού DNA, ή στη λύση των φυτοπλασματικών κυττάρων κατά την αποθήκευση του θρεπτικού διαλύματος στους -20 °C.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA από το θρεπτικό διάλυμα αξιολογήθηκαν βάσει της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε.

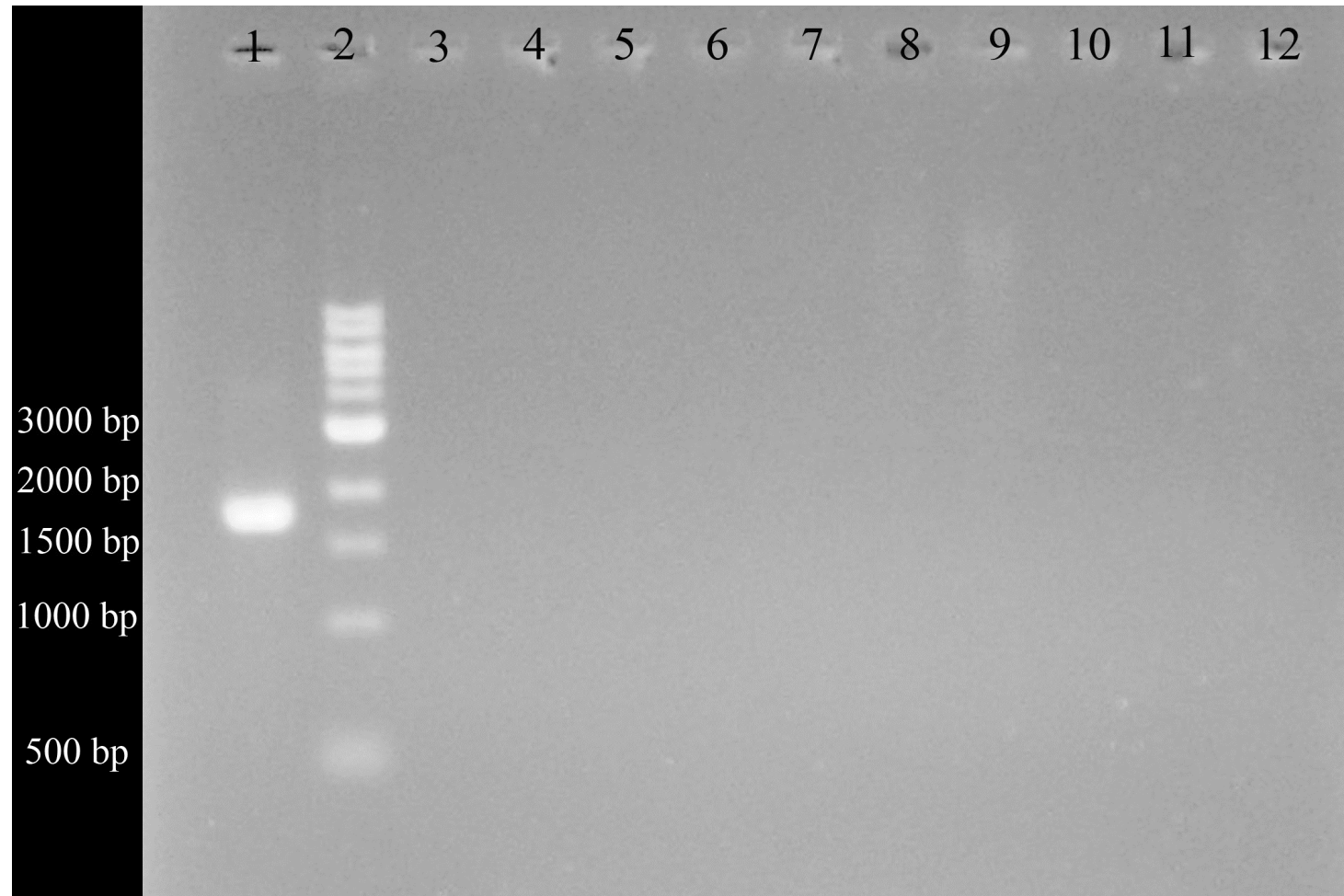
Η μέθοδος Α' ήταν ελαφρώς διαφοροποιημένη σε σχέση με τις μέθοδο απομόνωσης του ολικού DNA που χρησιμοποιήθηκε στα φυτά-ξενιστές και στα ημίπτερα έντομα. Όταν στο θρεπτικό διάλυμα προστέθηκαν DNA ασθενούς φυτού τομάτας από φυτοπλάσματα ή κλάσματα εμπλουτισμένα με φυτοπλάσματα από υγιή φυτά τομάτας δεν απομονώθηκε DNA. Όταν στο θρεπτικό διάλυμα προστέθηκαν κλάσματα εμπλουτισμένα με φυτοπλάσματα από ασθενή φυτά τομάτας η ποσότητα που

απομονώθηκε ήταν 14,8 ng/μL ή 0,2 μg/200μL θεραπευτικού διαλύματος (αρχική ποσότητα στο θεραπευτικό διάλυμα 0,97 μg/200μL θεραπευτικού διαλύματος) καθαρότητας $1,8 < A_{260}/A_{280} < 2,0$, η οποία ήταν αδύνατον να χρησιμοποιηθεί στην PCR, μιας και η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα είναι 50 ng/μL.

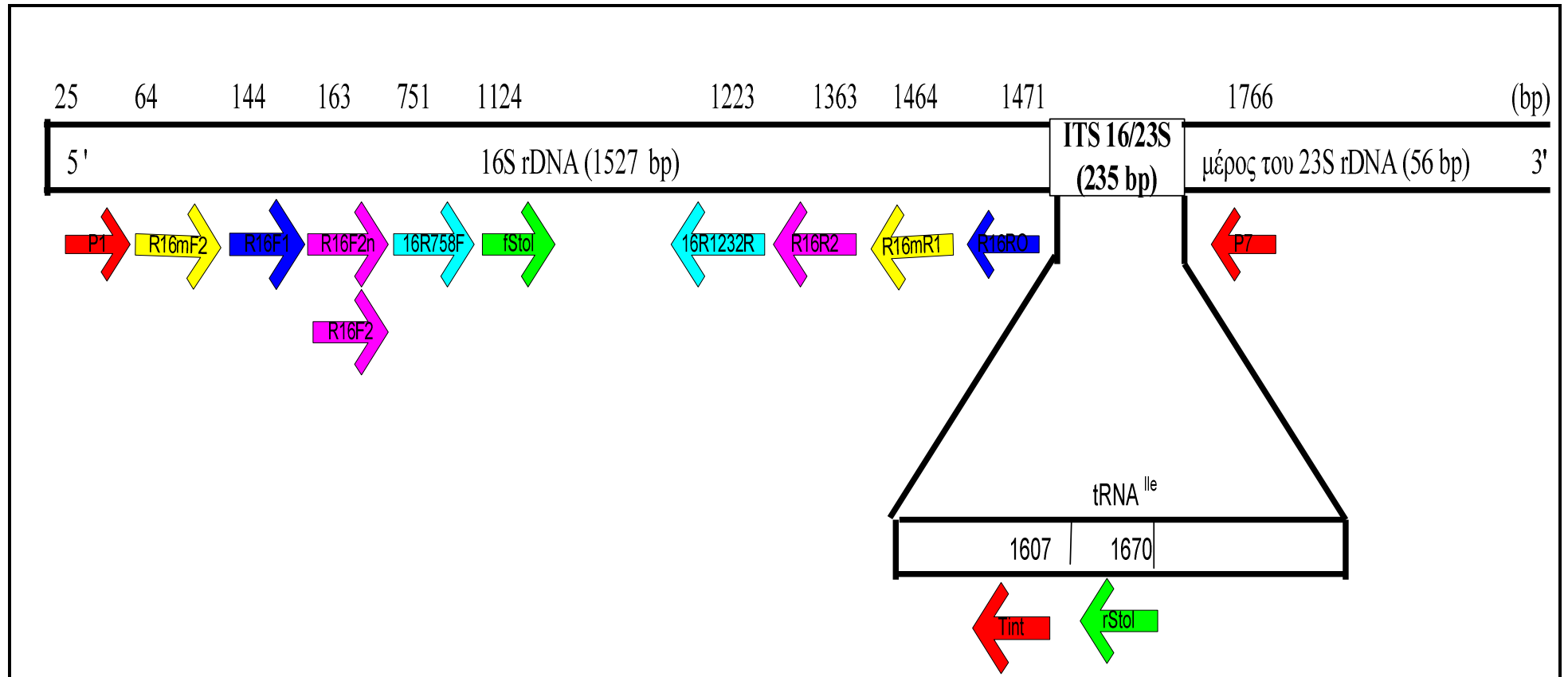
Με τη μέθοδο B', η οποία θεωρείται κατάλληλη για την απομόνωση του DNA από πολλά υποστρώματα, η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε ήταν 45 ng/μL ή 0,6 μg/200μL θεραπευτικού διαλύματος (αρχική ποσότητα στο θεραπευτικό διάλυμα 2,8 μg/200μL θεραπευτικού διαλύματος) με καθαρότητα (A_{260}/A_{280}) ίση με 1,2, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η χρήση της στην PCR.

4.4. Βιοπληροφορική

Με την βοήθεια της βάσεως δεδομένων EMBL βρέθηκε μέρος της αλληλουχίας βάσεων του γονιδίου 16S rDNA (1527 bp), της περιοχής ITS 16/23S rDNA (235 bp), και μέρος της 23S rDNA (56 bp) (αριθμός πρόσβασης AF24859). Με το πρόγραμμα BL2SEQ βρέθηκε ότι τα ζεύγη εκκινητών όπου υβριδίζουν στο γονίδιο 16/23S rDNA είναι: P1/P7, P1/Tint, R16mF2/R16mR1, R16F1/R16R0, 16R758F/16R1232R, R16F2/R16R2, R16F2n/R16R2, και fStol/rStol. Όσο αφορά το ζεύγος εκκινητών fU5/rU3, ο εκκινητής fU5 υβριδίζει στο 16S rDNA γονίδιο, ενώ ο εκκινητής rU3 παρόλο που αναφέρεται ότι υβριδίζει στο γονίδιο 16S rDNA (Lee *et al.*, 2001), σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος BL2SEQ δεν υβριδίζει σε κανένα σημείο της αλληλουχίας του 16/23S rDNA γονιδίου (Εικόνα 19).



Εικόνα 18. Διαχωρισμός ενισχυμένων τμημάτων DNA μετά PCR με χρήση των γενικευμένων εκκινητών P1/P7 σε δείγματα ημίπτερων εντόμων με την τεχνική της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Σειρά προϊόντων της PCR στην πηκτή αгарόζης 1: θετικός μάρτυρας, 2: Ladder 1 kb, 3: κενή θέση, 4: αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA, 5: αρνητικός μάρτυρας από υγιές φυτό, 6: κενή θέση, 7-11: δείγματα, 12: κενή θέση (αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR: 1800 bp)



Εικόνα 19. Διαγραμματική απεικόνιση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA, της περιοχής ITS 16/23S rDNA, και τμήματος του γονιδίου 23S rDNA του φυτοπλάσματος που προκαλεί την ασθένεια "stolbur", καθώς και των περιοχών όπου υβριδίζουν ζεύγη εκκινητών με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων EMBL, καθώς και του πακέτου δεδομένων SDSC Biology Workbench (με ίδιο χρώμα φαίνονται τα ζεύγη των εκκινητών). Στην επάνω σειρά αναγράφεται η θέση όπου υβριδίζει το 3' άκρο του κάθε εκκινητή (προσαρμογή από Smart *et al.*, 1996)

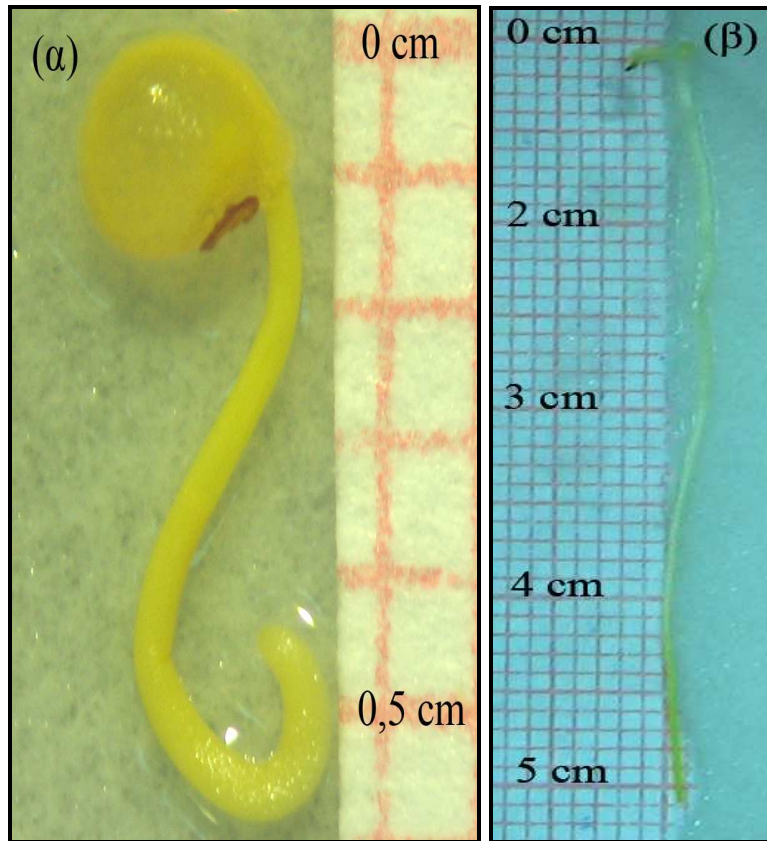
4.5. Δοκιμές παρασιτισμού φυτών από κουσκούτα

4.5.1. Βλαστικότητα και μήκος βλαστιδίου σπόρων κουσκούτας

Καθημερινά παρατηρήθηκε η πρόοδος βλάστησης και το μήκος των βλαστιδίων κουσκούτας. Το βλαστίδιο άρχισε να εμφανίζεται μετά από 4-5 ημέρες, όταν οι σπόροι βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ μετά από 2-3 ημέρες, όταν οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 30 °C. Το μήκος του βλαστιδίου κυμάνθηκε από 0,5 έως 1,5 cm μετά από 5-6 ημέρες από την τοποθέτηση των σπόρων σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ κυμάνθηκε από 0,5 έως 4,0 cm μετά από 5 ημέρες από την τοποθέτηση των σπόρων στους 30 °C (Εικόνα 20). Τέλος, η βλαστικότητα των σπόρων κυμάνθηκε από 70 έως 100%.

4.5.2. Πειράματα παρασιτισμού της κουσκούτας σε υγιή φυτά τομάτας και βίνκας

Σε όλες τις μεταχειρίσεις, μετά από 5 ημέρες από την τοποθέτηση των βλαστιδίων στο έδαφος παρατηρήθηκε ότι ο ιστός της κουσκούτας ήταν υδαρής, μαλακός με καστανό μεταχρωματισμό. Επίσης, σε όλες τις μεταχειρίσεις, μετά από 4-5 ημέρες από την τοποθέτηση των βλαστιδίων κουσκούτας στον βλαστό φυτών τομάτας και βίνκας διαπιστώθηκε αναστολή της ανάπτυξης, μαρasmus των ιστών της κουσκούτας λόγω έντονης διαπνοής, καθώς ακόμη και ανάπτυξη παθογόνων οργανισμών.



Εικόνα 20. Βλαστίδια σπόρων κουσκούτας μήκους (α) 0,5 cm και (β) 4,0 cm

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία πρωταρχικός στόχος ήταν η ταυτοποίηση των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" της τομάτας στην Ελλάδα, καθώς επίσης και η διερεύνηση της παρουσίας των φυτοπλάσμάτων σε ημίπτερα έντομα.

Η συχνότητα των ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπλάσματα μετρήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η ένταση της προσβολής στον αγρό. Η συχνότητα των ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπλάσματα άγγιξε το 12,5% σε αγρό στον Παλαμά Φθιώτιδας, ενώ σε αγρό στις Καρυές Φθιώτιδας ήταν 50-60%. Το ποσοστό συχνότητας της ασθένειας "stolbur" ήταν 1,25 – 10% το 1989 σε αγρό στη Β. Ελλάδα (Alivizatos, 1989), ενώ στην κεντρική Ιταλία ήταν 31-39% κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 1999-2000 (Del Serrone *et al.*, 2001).

Δείγματα που είχαν συλλεχθεί από διαφορές περιοχές της Ελλάδας με συμπτώματα προσβολής από φυτοπλάσματα ελέγχθηκαν με μοριακές τεχνικές. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 31 δείγματα, εκ των οποίων 9 είχαν τυπικά συμπτώματα της ασθένειας "stolbur", 16 χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας γιγαντοφθαμία, 3 παρουσίαζαν έντονο ιώδη μεταχρωματισμό στα φύλλα, και 3 δείγματα εμφάνιζαν συμπτώματα που δεν εντάσσονται σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες. Μετά την ανάκτηση ικανής ποσότητας και καθαρότητας DNA από φυτά τομάτας προσβεβλημένα με φυτοπλάσματα ακολούθησε PCR με το ζεύγος γενικευμένων εκκινητών P1/P7, ώστε να διαπιστωθεί αρχικά η παρουσία φυτοπλάσματος στα δείγματα. Από την PCR προέκυψαν προϊόντα με το αναμενόμενο μέγεθος (1800 bp). Σε όσα δείγματα έδωσαν θετική αντίδραση PCR P1/P7 έγινε εκ νέου PCR με το ζεύγος εξειδικευμένων εκκινητών fStol/rStol, ώστε να ελεγχθεί αν υπάρχουν φυτοπλάσματα της ομάδας XII - Stolbur group (Lee *et al.*, 2001). Από τα 31 δείγματα που εξετάστηκαν στα 28 δείγματα βρέθηκε

φυτοπλασματικό DNA, δηλαδή ποσοστό 90,3%, μετά από PCR με τους εκκινητές P1/P7. Αξίζει να τονιστεί ότι στο 100% των δειγμάτων που παρουσίαζαν συμπτώματα της ασθένειας γιγαντοφθαλμία και συμπτώματα που δεν κατατάσσονται σε καμία κατηγορία βρέθηκαν φυτοπλάσματα της ομάδας XII, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 88,8% και 33,3% για τα δείγματα που παρουσίαζαν συμπτώματα της ασθένειας "stolbur" και ιώδη μεταχρωματισμό στα φύλλα, αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά που αναφέρουν άλλοι ερευνητές. Οι Del Serrone *et al.* (2001) και οι Marzachi *et al.* (2000) χρησιμοποιώντας το ζεύγος των εξειδικευμένων εκκινητών fStol/rStol επιβεβαίωσαν την ύπαρξη φυτοπλασμάτων της ομάδας XII και I (μικτές μολύνσεις) σε φυτά τομάτας και στο αμπέλι, αντίστοιχα.

Ημίπτερα έντομα, τα οποία συλλέχθηκαν κατά την καλλιεργητική περίοδο 2006 (Ιούλιο-Οκτώβριο) από αγρούς στον Παλαμά και στις Καρυές Φθιώτιδας με φυτά τομάτας με συμπτώματα προσβολής από φυτοπλάσματα εξετάστηκαν με μοριακές τεχνικές προκειμένου να ανιχνευθεί η παρουσία φυτοπλάσματος. Μετά από PCR με γενικευμένους εκκινητές (P1/P7) στα έντομα δε βρέθηκε φυτοπλασματικό DNA. Η απουσία φυτοπλασματικού DNA στα έντομα πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν είναι φορείς του φυτοπλάσματος ή πιθανόν να συμπεριλαμβάνονται στα έντομα - φορείς και δεν πρόλαβαν να διατραφούν σε ασθενή φυτά. Επίσης, μπορεί να υπήρχαν μεγάλες απώλειες φυτοπλασματικού DNA κατά την απομόνωσή του από τα έντομα ή η περιεκτικότητα φυτοπλασματικών κυττάρων στην αιμολέμφο των εντόμων να ήταν μικρή. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε άλλες ερευνητικές μελέτες βρέθηκε με χρήση PCR φυτοπλασματικό DNA της ομάδας XII στα έντομα. Οι Sabate *et al.* (2003) διαπίστωσε την παρουσία φυτοπλάσματος σε έντομα που προκαλούν την ασθένεια "Bois noir" (υπο-ομάδα stolbur) μετά από PCR με τη χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών fStol/rStol. Επίσης, ο Tanne και οι συνεργάτες του (2001) μετά από τη χρήση των γενικευμένων εκκινητών P1/P7 στην PCR και τη χρησιμοποίηση των γενικευμένων

εκκινητών fU5/rU3 σε "nested PCR" επιβεβαίωσε την ύπαρξη φυτοπλασμάτων σε έντομα (46-100% των εντόμων), τα οποία ανήκουν στην ομάδα I (Aster yellows group). Επιπλέον, οι Maixner *et al.* (1995) επαλήθευσαν την ύπαρξη φυτοπλασμάτων στο έντομο *Hyalesthes obsoletus*, το οποίο προκαλεί την ασθένεια "Vergilbungskrankheit" (υπο-ομάδα stolbur) στο αμπέλι, μετά από PCR με τους εκκινητές fStol/rStol. Τέλος, οι Gatineau *et al.* (2001) επιβεβαίωσαν την παρουσία φυτοπλασμάτων της ομάδας XII σε έντομα του γένους *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae) (1997: 0-13,3% των εντόμων, 1998: 0-11,8% των εντόμων) μετά από χρήση των προϊόντων της PCR με εκκινητές fU5/rU3 για ανάλυση πολυμορφισμού μήκους κλασμάτων περιορισμού DNA (RFLPs) με το ένζυμο περιορισμού *Tru9I*.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διατροφής των πιθανών φορέων σε θρεπτικό υπόστρωμα (διάλυμα 5% σακχαρόζης σε TE) για να ελεγχθεί η παρουσία φυτοπλασμάτων στο θρεπτικό διάλυμα. Το θρεπτικό διάλυμα αποθηκεύονταν στους -20 °C και στη συνέχεια ακολουθούσε φυγοκέντρωση, ώστε να διαπιστωθεί η παρουσία ιζήματος, δηλαδή φυτοπλασματικών κυττάρων σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται από τους Tanne *et al.* (2001). Μετά την φυγοκέντρωση δεν διαπιστώθηκε η παρουσία ιζήματος (φυτοπλασματικά κύτταρα) στο θρεπτικό διάλυμα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην απουσία ή στη μικρή ποσότητα φυτοπλασμάτων, ή στη λύση των φυτοπλασματικών κυττάρων κατά την αποθήκευση του θρεπτικού διαλύματος στους -20 °C. Επιπλέον, οι προσπάθειες απομόνωσης φυτοπλασμάτων που πιθανώς να έχουν μεταδοθεί στο θρεπτικό διάλυμα από έντομα – φορείς απέβησαν άκαρπες. Για να ελεγχθεί εάν οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατάλληλες για απομόνωση DNA από υλικό πλούσιο σε σάκχαρα, σε 200 μL θρεπτικού διαλύματος προστέθηκαν 20 μL τμημάτων φυτικών κυττάρων τομάτας με φυτοπλασματικά κύτταρα (0,97 μg/200μL θρεπτικού διαλύματος) και με τη μέθοδο A' απομονώθηκαν 14,8 ng/μL ή 0,2 μg/200μL θρεπτικού διαλύματος (Lee *et al.*, 2001; Ahrens and Seemüller, 1992; Sabaté *et al.*,

2003; Doyle and Doyle, n.d.). Με τη μέθοδο B', σε 200 μL θρεπτικού διαλύματος προστέθηκαν 20 μL DNA υγιούς φυτού τομάτας (2,8 $\mu\text{g}/200\mu\text{L}$ θρεπτικού διαλύματος) με καθαρότητα $1,8 < A_{260}/A_{280} < 2,0$, και η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε ήταν 45 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ή 0,6 $\mu\text{g}/200\mu\text{L}$ θρεπτικού με καθαρότητα (A_{260}/A_{280}) ίση με 1,2. Και στις δύο περιπτώσεις η απώλεια ήταν πολύ μεγάλη, ενώ η καθαρότητα του DNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο B' δεν ήταν η επιθυμητή ($1,8 < A_{260}/A_{280} < 2,0$). Η μέθοδος B' είχε εφαρμοστεί με επιτυχία από άλλους ερευνητές για την απομόνωση DNA από φυτικούς ιστούς πλούσιους σε σάκχαρα (ρίζες ζαχαρότευτλων), γι' αυτό και δοκιμάστηκε στην προκειμένη περίπτωση μιας και το θρεπτικό διάλυμα είχε μεγάλη ποσότητα σακχάρων (KWS SAAT AG and Monsanto Company, 2006).

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν παραπάνω, είναι βέβαιο ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα ως προς τις μεθόδους απομόνωσης φυτοπλασματικού DNA από το θρεπτικό διάλυμα. Η παρουσία φυτοπλασματικού DNA σε θρεπτικό διάλυμα δεν επιβεβαιώνει ότι τα έντομα είναι φορείς φυτοπλάσμάτων. Ακόμη και αν μέσω της PCR σε θρεπτικό διάλυμα βρεθεί φυτόπλασμα δεν μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα ότι τα έντομα που διατράφηκαν ήταν φορείς, μιας και είναι πιθανόν να είχαν διατραφεί σε φυτά προσβεβλημένα από φυτόπλασμα, να είχαν παραλάβει το φυτόπλασμα κατά τη διατροφή τους, αλλά να μην μπορούν να το μεταδώσουν (Tanne *et al.*, 2001). Για να εξασφαλιστεί σε σύντομο χρονικό διάστημα ότι τα έντομα είναι φορείς φυτοπλάσμων πραγματοποιούνται πειράματα μετάδοσης. Σύμφωνα με αυτά τα πειράματα, τα έντομα είναι απαλλαγμένα από φυτοπλάσματα και διατηρούνται σε αποικίες στο εργαστήριο, όπου και διατρέφονται για καθορισμένο χρονικό διάστημα (περίοδος διατροφής – προσλήψεως) σε φυτά προσβεβλημένα με φυτοπλάσματα. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε ενδιάμεσους ξενιστές και διατρέφονται για ορισμένο χρονικό διάστημα (περίοδος εμβολιασμού). Έπειτα, τα έντομα τοποθετούνται σε μικροκλωβούς για εκτροφή σε θρεπτικό διάλυμα, και τότε η παρουσία φυτοπλασματικού DNA στο διάλυμα

επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι είναι φορείς και μπορούν να μεταδώσουν το φυτόπλασμα (Tanne *et al.*, 2001). Επίσης, με τα πειράματα μετάδοσης είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η "περίοδος εμβολιασμού" κάθε είδους, η αναλογία θηλυκών προς αρσενικών ατόμων του ίδιου είδους που μεταδίδουν φυτοπλάσματα, καθώς και η ικανότητα μετάδοσης φυτοπλάσμάτων από τα έντομα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Garcia-Chara *et al.*, 2005).

Δοκιμές παρασιτισμού με κουσκούτα πραγματοποιήθηκαν σε υγιή φυτά τομάτας και βίνκας. Σκοπός αυτών των δοκιμών ήταν η μετάδοση φυτοπλάσμάτων από ασθενή φυτά τομάτας σε υγιή φυτά τομάτας και βίνκας μέσω της κουσκούτας. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το ποσοστό βλαστικότητας των σπόρων κουσκούτας ήταν 70-100%, καθώς και το μήκος του βλαστιδίου κυμαίνονταν μεταξύ 0,5 και 4,0 cm. Παρόλα αυτά όμως τα βλαστίδια κουσκούτας παρουσίασαν έντονα συμπτώματα μαρασμού όταν τοποθετήθηκαν στο έδαφος ή στον βλαστό των φυτών, με αποτέλεσμα η κουσκούτα να μην προσκολληθεί σε υγιή φυτά τομάτας και βίνκας. Η αποτυχία προσκόλλησης της κουσκούτας σε φυτά τομάτας και βίνκας πιθανόν να οφείλεται στους χειρισμούς ή στην ποικιλία/υβρίδιο τομάτας και ποικιλία βίνκας που χρησιμοποιήθηκαν, ή/και τέλος στις συνθήκες που επικρατούσαν κατά την παραμονή των βλαστιδίων στα φυτά (θερμοκρασία, φωτισμός). Η απόσταση στην οποία τοποθετήθηκαν τα βλαστίδια στο έδαφος (0,5 cm από το φυτό) δεν αναφέρεται να είναι ανασταλτικός παράγοντας στην ανάπτυξη σχέσης παρασιτισμού μεταξύ κουσκούτας και τομάτας. Σε πειράματα παρασιτισμού της κουσκούτας σε ζαχαρότευτλα από τους Benvenouti *et al.* (2005) βρέθηκε ότι ακόμη και σε απόσταση 6 cm από τα φυτά η κουσκούτα παρασιτούσε σε φυτά-ξενιστές. Η ικανότητα παρασιτισμού της κουσκούτας εξαρτάται κυρίως από τα ενεργειακά αποθέματα του σπόρου μέχρι να συναντήσει τον βλαστό του ξενιστή, και από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Benvenouti *et al.*, 2005). Επιπλέον, στα ζαχαρότευτλα βρέθηκε ότι το ποσοστό παρασιτισμού ήταν μεγαλύτερο

σε φυτά με 6-8 φύλλα, σε σύγκριση με φυτά με 4 φύλλα. Επίσης, σε αντίστοιχες μελέτες παρασιτισμού σε φυτά καπνού, όταν η κουσκούτα τοποθετήθηκε στον βλαστό των φυτών ανέπτυξε μυζητήρες μετά από 7-14 ημέρες, κάτι το οποίο δεν επιτεύχθηκε στην παρούσα εργασία (Raine *et al.*, 1986).

Τέλος, ενδιαφέρον θα ήταν η διαπίστωση της παρουσίας φυτοπλασμάτων σε ζιζάνια και υπολείμματα καλλιεργειών μιας και η συλλογή των ημίπτερων εντόμων έγινε στους φυτοφράχτες, και όχι σε φυτά τομάτας. Εξάλλου, οι Battle και οι συνεργάτες του (2000) επιβεβαίωσαν την παρουσία φυτοπλασμάτων της ομάδας XII σε ζιζάνια όπως η περικοκλάδα, η λεβάντα, η αγριοτομάτα, το πεντάνευρο, και το βάτο. Επίσης, οι Maixner *et al.* (1995) επιβεβαίωσαν την παρουσία φυτοπλασμάτων που προκαλούν την ασθένεια "stolbur" στην περικοκλάδα και στην αγριοτομάτα, ενώ οι Schneider *et al.* (1997a) απέδειξαν ότι στην περικοκλάδα υπάρχουν φυτοπλάσματα υπεύθυνα για την πρόκληση της ασθένειας "stolbur". Αυτό σημαίνει ότι τα ζιζάνια και τα υπολείμματα καλλιεργειών πιθανόν να αποτελούν τους εναλλακτικούς ξενιστές σε περιόδους που δεν υπάρχει η καλλιέργεια, συμβάλλοντας έτσι στη διαχείμαση και διατήρηση των φυτοπλασμάτων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Ahrens, U., and Seemüller, E. (1992). Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, **82**, 828-832.

Alivizatos, A.S. (1989). Occurrence and distribution of tomato stolbur in Greece. *Proceedings of the 7th conference on Plant Pathogenic Bacteria, Budapest, Hungary*, pp. 945–950.

Alivizatos, A.S. (1993). Association of mycoplasma – like organisms with tomato big bud disease in Greece. *Plant Pathology*, **42**, 158-162.

Baker, K.K., Ramsdell, D.C., Gillert, J.M. (1985). Electron microscopy: current applications to plant virology. *Plant Disease*, **69**, 85-90.

Battle, A., Martínez, M.A., and Lavina, A. (2000). Occurrence, distribution and epidemiology of grapevine yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, **106**, 811–816.

Benvenouti, S., Dinelli, G., Bonetti, A., and Catizone, P. (2005). Germination ecology, emergence and host detection in *Cuscuta campestris*. *Weed Research*, **45**, 270-278.

Bertaccini, A., Franova, J., Paltrinieri, S., Martini, M., Navrati, M., Lugaresi, C., Nebesarova, J., and Simkova, M. (1999). Leek proliferation: A new phytoplasma disease in the Czech Republic and Italy. *European Journal of Plant Pathology*, **105**, 487–493.

Bertamini, M., and Nedunchezian, N. (2001). Effects of phytoplasma [stolbur – subgroup (*Bois noir*)] on photosynthetic pigments saccharides, ribulose 1,5 – biphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases, and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Photosynthetica*, **39**, 119-122.

Boudon-Padieu, E. (1999). Grapevine phytoplasmas. In the Proceedings of *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes*, May, 24th-29th, 1999. [Online]. Available at <<http://web.uniud.it/phytoplasma//conf.html>>. [Access date: 08/05/2006].

Bové, J.M., and Garnier, M. (1998). Walled and wall-less eubacteria from plants: sieve-tube-restricted plant pathogens. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **52**, 7-16.

Carraro, L. Loi, N., and Ermacora, P. (2001) Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 695–700.

Castro, S., and Romero, J. (2002). The association of clover proliferation phytoplasma with stolbur disease of pepper in Spain. *Journal of Phytopathology*, **150**, 25-29.

Chinery, M. (1993). Collins field guide. Insects of Britain & northern Europe. 3rd ed., Harper Collins Publishers, London, pp. 114-117.

Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., and Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, **10**, 526-535.

Del Serrone, P., Marzachi, C., Bragaloni, M., and Gale, P. (2001). Phytoplasma infection of tomato in central Italy. *Phytopathology Mediterranea*, **40**, 137–142.

Dietrich, C.H. (2005). Keys to the families of Cicadomorpha and subfamilies and tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Florida Entomologist*, **88**, 502-517.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (n.d.). DNA isolation from small amounts of plant tissue. [Online]. Available at <<http://irc.igd.cornell.edu/Protocols/DoyleProtocol.pdf>>. [Access date: 31/03/2006].

EPPO/CABI (2006). Data sheets on quarantine pests: potato stolbur phytoplasma. [Online]. Available at <http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Stolbur/PHYP10_ds.pdf>. [Access date: 08/04/2006].

Feeley, C.J. Hart, E.R., Thompson, J.R., and Harrington, T.C. (2001). Occurrence, associated symptoms, and potential insect vectors of the ash yellows phytoplasma in Iowa, U.S. *Journal of Arboriculture*, **27**, 331-340.

Garcia-Chapa, M., Sabate, J., Lavina, A., and Battle, A. (2004). Role of *Cacopsylla pyri* in the epidemiology of pear decline in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, **111**, 9–17.

Garnier, M. (1999). Epidemiology and control of phytoplasma diseases. In the Proceedings of *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes*, May, 24th-29th, 1999. [Online]. Available at <<http://web.uniud.it/phytoplasma/conf.html>>. [Access date: 08/05/2006].

Garnier, M., Foissac, X., Gaurivaud, P., Laigret, F., Renaudin, J., Saillard, C., and Bové, J.M. (2001). Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. *Life Sciences*, **324**, 923–928.

Gatineau, F., Larrue, J., Clair, D., Lorton, F., Richard-Molard, M., and Boudon-Padieu, E. (2001). A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 263–271.

Gundersen, D.E., Lee, I.-M., Rehner, S.A., Davis, R.E., and Kingsbury, D.T. (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): A basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, **176**, 5244-5254.

Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S., and Damak, S. (2002) Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology*, **11**, 97–103.

Institute for Plant Protection and Environment Belgrade (2004). Vectors of phytoplasma on grapevine. [Online]. Available at <http://www.chem.bg.ac.yu/~mario/scaphoideus/English/side_5_vectors.htm>. [Access date: 08/04/2006].

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group (2004). ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for the wall-less, non helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1243-1255.

Kamoun, S. and Hogenhout, S.A. (2001). Agricultural microbes genome 2: First glimpses into the genome of plant associated microbes. *The Plant Cell*, **13**, 451-458.

KWS SAAT AG and Monsanto Company (2006). *Sampling and DNA extraction of sugar beet H7-1. Report from the validation of the "CTAB Precipitation/Genomic-tip" method for DNA extraction from ground sugar beet seeds*. European Commission Community Reference Laboratory for GM Food AND Feed [Online]. Available at <http://gmo-crl.jrc.it/summaries/H7-1-DNAExtr_sampl.pdf>. [Access date: 18/09/2006].

Laviña, A., and Batlle, A. (2002). First report of stolbur phytoplasma in avocado in Spain. *Plant Disease*, **86**, 692.

Lee, I.M. (1999). Molecular-based methods for the detection and identification of phytoplasmas. In the Proceedings of *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes*, May, 24th-29th, 1999. [Online]. Available at <<http://web.uniud.it/phytoplasma//conf.html>>. [Access date: 08/05/2006].

Lee, I.M., Davis, R.E., and Gundersen-Rindal, D.E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic *Mollicutes*. *Annual Review of Microbiology*, **54**, 221–255.

Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., and Bertaccini, A. (1998a). Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, **88**, 1359–1366.

Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., and Bartoszyk, I.M. (1998b). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 1153–1169.

Lee, I-M, Davis, R.E., and Fletcher, J. (2001). In *Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd ed. (Schaad, N.W., Jones, J.B., Chum, W. eds.), APS Press, Minnesota, USA, pp. 283-320.

Maixner, M., Ahrens, U., and Seemüller, E. (1995). Detection of the German grapevine yellows (*Vergilbungskrankheit*) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, **101**, 241–250.

Marcone, C., Neimark, A., Ragozzino, A., Lauer, U., and Seemuller, E. (1999). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, **89**, 805–10.

Martin, M., Daniels, P.P., Torres, E., and Telleria, M.T. (2003). Detection and identification of phytoplasma DNA in symptomatic mushrooms of the genus *Ramaria* (*O. gomphales*). *Anales Jardin Botanico De Madrid*, **60**, 11-18.

Marzachì, C., Veratti, F., d'Aquilio, M., Vischi, A., Conti, M., and Boccardo, G., (2000). Molecular hybridization and PCR amplification of non-ribosomal DNA to detect and differentiate stolbur phytoplasma isolates from Italy. *Journal of Plant Pathology*, **82**, 201-212.

McCoy, R.E. (1982). Use of tetracycline antibiotics to control yellow disease. *Plant Disease*, **66**, 539-542.

Milkus, B., Clair, D., Idir, S., Habili, N., and Boudon-Padieu, E. (2005). First detection of stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay) affected with grapevine yellows in the Ukraine. *Plant Pathology*, **54**, 236.

Musetti, R. and Favali, M.A. (2004). Microscopy techniques applied to the study of phytoplasma diseases: Traditional and innovative methods. In *Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education*, (Mendez-Vilas, A. and Labajos-Biancano, L. eds.) FORMATEX. [Online]. Available at <<http://www.formatex.org/microscopy2/papers/72-80.pdf>>. [Access date: 10/04/2006].

Orenstein, S., Zahavi, T., Nestel, D., Sharon, R., Barkalifa, M., and Weintraub, P.G. (2003). Spatial dispersion patterns of potential leafhopper and planthopper (Homoptera) vectors of phytoplasma in wine vineyards. *Annals of Applied Biology*, **142**, 341-348.

Oxford University (1999). Practical Approach on CD-ROM/2. Oxford CD-ROM. IBM PC Version 2.0. Oxford University Press, Optimedia Ltd.

Petrovic, N., Seljak, N., Matis, G., Miklave, J., Beber, K., Bobenl, J., and Ravnikar, M. (2003). The presence of grapevine yellows and their potential natural vectors in wine-growing regions of Slovenia. In *14th International council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevines, Extended Abstracts*, 12-17th September, 2003, Locorotondo, Italy, pp. 97.

Pilkington, L.J., Gibb, K.S., Gurr, G.M., Fletcher, M.J., Nikandrow, A., Elliott, E., van de Ven, R., and Read, D.M.Y. (2003). Detection and identification of a phytoplasma from lucerne with Australian lucerne yellows disease. *Plant Pathology*, **52**, 754–762.

Pracros, P., Renaudin, J., Eveillard, S., Mouras, A., and Hernould, M. (2006). Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 62-68.

Raine, J., McMullen, R.D., and Forbes, A.R. (1986). Transmission of the agent causing little cherry disease by the apple mealybug *Phenacoccus aceris* and the dodder *Cuscuta lupuliformis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **8**, 6-11.

Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathology of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 1094–156.

Sabaté, J., Lavina, A., and Battle A. (2003). Potential vectors of grapevine *Bois Noir* phytoplasma in Spain and evaluation of their transmission capacity. In *14th International council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevines, Extended Abstracts*, 12-17th September, 2003, Locorotondo, Italy, pp. 67.

Sambrook, K.J., Fritsch, E.F., and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schneider, B., Marcone, C., Kampmann, M., Ragozzino, A., Lederer, W., Cousin, M.-T. and Seemüller, E. (1997a). Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 675-686.

Schneider, B., Gibb, K.S., and Seemüller, E. (1997b). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, **143**, 3381–3389.

Scottish Crop Research Institute (2002). Immunogold labelling (IGL). [Online]. Available at <http://www.scri.sari.ac.uk/assoc/NEWSTRUC/BioMech/CellBiol/Microsc/IGL.htm>. [Access date: 10/07/2006].

Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., and Göschl, M. (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, **80**, 3-26.

Seruga, M., Curkovic Perica, M., Skoric, D., Kozina, B., Mirosevic, N., Saric, A., Bertaccini, A., and Krajacic, M. (2000). Geographical distribution of *Bois Noir* phytoplasmas infecting grapevines in Croatia. *Journal of Phytopathology*, **148**, 239-242.

Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.G., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H., Seemuller, E., and Kirkpatrick, B.C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 2988–2993.

Tanne, E., Boudon-Padieu, E., Clair, D., Davidovich, M., Melamed, S., and Klein, M. (2001). Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. *Bacteriology*, **91**, 741-746.

Terlizzi, F., Babini, A.R., and Credi, R. (2006). First report of stolbur phytoplasma (16SrXII-A) on strawberry in northern Italy. *Plant Disease*, **90**, 831.

6.2. Ελληνική Βιβλιογραφία

Αλιβιζάτος, Α.Σ. και Γλυνός, Π (1994). Ανίχνευση DNA φυτοπαθογόνων μυκοπλασμάτων με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). *Πρακτικά 7^ο Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου*, 8-10 Νοεμβρίου, 1994, Αθήνα, σελ. 68.

Ρούμπος, Ι.Χ. (1985α). Έρευνες επί του ικτέρου της αμπέλου με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. *Πρακτικά 3^ο Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου*, 16-18 Οκτωβρίου, 1985, Βόλος, σελ. 27.

Ρούμπος, Ι.Χ. (1985β). Ασθένειες φυτών που αποδίδονται σε μικροοργανισμούς τύπου μυκοπλάσματος στην Ελλάδα. *Πρακτικά 3^ο Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου*, 16-18 Οκτωβρίου, 1985, Βόλος, σελ. 41.

Σαΐνης, Π.Α., Δόβας, Χ.Ι. και Κατής, Ν.Ι. (2006). Εστιασμένη PCR με γενικούς και εξειδικευμένους εκκινητές για την ανίχνευση φυτοπλάσμάτων σε διάφορους ξενιστές στην Ελλάδα. *Πρακτικά 13^ο Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου*, 16-19 Οκτωβρίου, 2006, Αθήνα, σελ. 21.