

Ιοειδή: τα μικροσκοπικά αλλά δυναμικά παθογόνα των φυτών

Λ. Χ. Παπαγιάννης και Θ. Καπαρή-Ησαΐα

Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών

Κλάδος Φυτοπροστασίας

Υπουργείο Γεωργίας, Αγροτικής Ανάπτυξης και Περιβάλλοντος



Δεκέμβριος 2015, Λευκωσία

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΚΛΑΔΟΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΓΕΩΡΓΙΑΣ, ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



**ΙΟΕΙΔΗ: ΤΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΑ ΑΛΛΑ ΔΥΝΑΜΙΚΑ
ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ**

Λ. Χ. Παπαγιάννης και Θ. Καπαρή-Ησαΐα

ISSN 1986-1370

Υπεύθυνοι Έκδοσης

Δρ Μ. Κυριάκου

Δρ Γ. Χατζηπαύλου

Άγγελος Κυρατζής

Για τις πληροφορίες, που περιέχονται στην παρούσα έκδοση, την αποκλειστική ευθύνη φέρουν οι συγγραφείς. Τυχόν χρησιμοποίηση εμπορικών ονομάτων δεν σημαίνει ότι το Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών υποστηρίζει συγκεκριμένα προϊόντα ούτε αποτελεί διάκριση κατά οποιωνδήποτε προϊόντων.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
Ιοί και ιοειδή: ομοιότητες και διαφορές	8
Ταξινόμηση και ονοματολογία ιοειδών	9
Εύρος ξενιστών και συμπτώματα	11
Τρόποι μετάδοσης των ιοειδών	12
Διάγνωση των ιοειδών	13
<i>α. Βιοδοκιμές</i>	13
<i>β. Μοριακές δοκιμές</i>	14
Αντιμετώπιση των ιοειδών	14
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΙΟΕΙΔΗ	17
A. Επισκόπηση εσπεριδοειδών για την παρουσία ιοειδών	17
B. Ανάπτυξη νέων διαγνωστικών δοκιμών για την ανίχνευση ιοειδών	18
Γ. Επίδραση ιοειδών στα φυτά ξενιστές	20
Δ. Προγράμματα εξάλειψης ιοειδών και παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού δενδρωδών καλλιεργειών στην Κύπρο.....	23
Δ1. Πρόγραμμα Εξυγίανσης αξιόλογων κλώνων και ποικιλιών εσπεριδοειδών της Κύπρου.....	24
Δ2. Πρόγραμμα Εξυγίανσης ελληνικών <i>elite</i> ποικιλιών εσπεριδοειδών.....	25
E. Διερεύνηση της παρουσίας ιοειδών σε διάφορες καλλιέργειες της Κύπρου	25
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	27

Περίληψη

Τα ιοειδή είναι τα μικρότερα και πιο απλά παθογόνα φυτών που γνωρίζουμε σήμερα. Αποτελούνται από κυκλικό ριβοζονουκλεϊνικό οξύ (RNA) απλής αλυσίδας που δεν ξεπερνά τα 400 νουκλεοτίδια. Παρά το υπερ-μικροσκοπικό τους μέγεθος, είναι ικανά να αναπαράγονται σε ευπαθείς ξενιστές και σε κάποιες περιπτώσεις προκαλούν σημαντικές ασθένειες. Τα συμπτώματα που προκαλούν μοιάζουν με αυτά των φυτικών ιών και συνήθως αναφέρονται σε νανισμό, μωσαϊκό, ποικιλοχλώρωση, παραμόρφωση και νέκρωση ιστών. Ωστόσο, υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες η μόλυνση δεν οδηγεί στην εκδήλωση ορατών συμπτωμάτων. Μεταδίδονται πολύ εύκολα από φυτό σε φυτό με μηχανικό τρόπο, δηλαδή με τη μεταφορά μολυσμένου χυμού μέσω εργαλείων, χειρών, καθώς και με μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί 30 διαφορετικά είδη ιοειδών που προσβάλλουν αρκετά λαχανοκομικά, καλλωπιστικά ή αυτοφυή φυτά, αλλά και πολλές δενδρώδεις καλλιέργειες. Αρκετά από αυτά κατατάσσονται στα φυτοπαθογόνα καραντίνας για την Ευρωπαϊκή Ένωση και διέπονται από αυστηρές οδηγίες και κανονισμούς. Η διάγνωσή τους πραγματοποιείται με βιολογικές και μοριακές δοκιμές. Η αντιμετώπιση των ιοειδών στηρίζεται στη χρήση υγιούς φυτικού υλικού και στη λήψη μέτρων υγιεινής. Ο Κλάδος Φυτοπροστασίας του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών (ΙΓΕ) συμμετείχε σε εθνικά, διακρατικά και ευρωπαϊκά ερευνητικά προγράμματα σχετικά με την ταυτοποίηση, την παρουσία, την επίδραση και την αντιμετώπιση των σημαντικότερων ιοειδών στην Κύπρο.

Εισαγωγή

Τα ιοειδή είναι κυκλικά μόρια ριβοζονουκλεϊνικού οξέως (RNA) απλής αλυσίδας τα οποία προσβάλλουν διάφορα είδη του φυτικού βασιλείου. Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού παρά το μικροσκοπικό τους μέγεθος και την απλή τους δομή, μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες σε λαχανοκομικά, ανθοκομικά και δενδρόδη είδη και έχουν συσχετιστεί με σημαντικές οικονομικές απώλειες. Έγιναν γνωστά ως παθογόνα των φυτών για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1960 όταν οι ερευνητές της εποχής προσπαθούσαν να προσδιορίσουν το αίτιο της ασθένειας των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας που για μακρύ χρονικό διάστημα αποδιδόταν σε ιό. Μετά από σειρά εργαστηριακών δοκιμών διαπιστώθηκε ότι το παθογόνο αίτιο αποτελείτο από ελεύθερο RNA, ήταν μικρότερο από τους γνωστούς ιούς και παρουσίαζε δομικές και βιοχημικές διαφορές από αυτούς (Hammond and Owens, 2006). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και για μια άλλη γνωστή ασθένεια στα εσπεριδοειδή, την εξωκόρτιδα. Το 1971 προτάθηκε σε αυτή τη νέα κατηγορία φυτοπαθογόνων η ονομασία ιοειδή (viroids) αφενός για να διαχωριστεί από την κατηγορία των φυτικών ιών (viruses) και αφετέρου για να τονιστεί και η ομοιότητα που είχαν με τους ιούς οι οποίοι ήταν γνωστοί από τις αρχές του 19^{ου} αιώνα (Diener, 1971). Είναι γεγονός ότι καμία από τις γνωστές ασθένειες που προκαλούνται από ιοειδή δεν είχε παρατηρηθεί ή καταγραφεί από τον 19^ο αιώνα. Πιστεύεται ότι στη διάδοση των ιοειδών έχει συμβάλει η εντατική καλλιέργεια και η μονοκαλλιέργεια φυτικών ειδών σε συνδυασμό με την ευκολία μετάδοσης των παθογόνων με μηχανικά μέσα.

Το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) ήταν το πρώτο παθογόνο της κατηγορίας των ιοειδών που μελετήθηκε και βρέθηκε να σχετίζεται με σημαντική υποβάθμιση της πατατοπαραγωγής (Diener and Raymer, 1967). Την ίδια περίοδο ταυτοποιήθηκε και το ιοειδές της εξωκόρτιδας των εσπεριδοειδών (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) που προκαλεί έντονο νανισμό και ρωγμές στον φλοιό ευπαθών υποκειμένων όπως η τρίφυλλη πορτοκαλιά και η γλυκολεμονιά (Semancik and Weathers, 1972). Παρά τα περιορισμένα εργαστηριακά μέσα της δεκαετίας του 1970, η πρώτη επαφή της επιστημονικής κοινότητας με τα ιοειδή έδωσε τη δυνατότητα για τη διερεύνηση και την επίλυση πολλών φυτοπαθολογικών προβλημάτων και ασθενειών με άγνωστη αιτία και προέλευση, που ταλάνιζαν τη γεωργική παραγωγή σε διεθνές επίπεδο. Ανάμεσα στα πολλά παραδείγματα σημειώνεται και η περίπτωση της ασθένειας Cadang-cadang που οφειλόταν στο ιοειδές *Coconut cadang cadang viroid* (CCCVd), που παρουσιάστηκε περί τα μέσα της δεκαετίας του 1950 και αποξήρανε περισσότερα από 40 εκατομμύρια δέντρα κοκκοφοίνικα στις Φιλιππίνες. Σε συνδυασμό με την προσβολή από το ιοειδές *Coconut Tinangaja Viroid* (CTiVd) η παγκόσμια βιομηχανία παραγωγής καρύδας είχε υποστεί τεράστιες οικονομικές απώλειες (Radles and Rodriguez, 2003). Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ιοειδές της κηλίδωσης του Αβοκάντο (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) που ευθυνόταν για την έντονη παραμόρφωση και τον μεταχρωματισμό των καρπών σε περιοχές της Αμερικής, Αφρικής και της Ευρώπης (Duran-Vila and Semancik, 2003). Υπάρχουν επίσης παραδείγματα εσπεριδοειδοπαραγωγών χωρών που υπέστησαν μεγάλες ζημιές από την

εξωκόρτιδα και την καχεξία, μετά από χρήση ευπαθών στις ασθένειες υποκειμένων (Semancik *et al.*, 1997). Η ραγδαία ανάπτυξη των βιολογικών επιστημών κατά την περίοδο 1980-90, ήταν καθοριστική για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό αρκετών ιοειδών που ήταν υπεύθυνα για την πρόκληση επιβλαβών συμπτωμάτων και ασθενειών σε εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα, γιγαρτόκαρπα, φοίνικες, αμπέλια, κολοκυνθοειδή, σολανώδη και ανθοκομικά είδη.

Ιοί και ιοειδή: ομοιότητες και διαφορές

Τα ιοειδή παρουσιάζουν κοινά γνωρίσματα με τους ιούς αλλά διαφέρουν σε βασικά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος, η δομή, η λειτουργία και η προέλευση. Οι **φυτικοί ιοί** είναι μικρά μόρια που αποτελούνται από μία ή περισσότερες αλυσίδες νουκλεϊνικών οξέων (RNA ή DNA) και περιβάλλονται από ένα περίβλημα πρωτεΐνης ή λιποπρωτεΐνης, που καλείται καψίδιο. Η μορφολογία των φυτικών ιών διαφέρει σε σχήμα και μέγεθος. Το σχήμα τους συνήθως έχει νηματοειδή, σφαιρική ή ραβδοειδή μορφή. Το μέγεθος του γενώματος τους κυμαίνεται από 10^3 - 10^6 νουκλεοτίδια, τα οποία διατάσσονται κατά τρόπο ώστε να κωδικοποιούν μία ή περισσότερες πρωτεΐνες που είναι λειτουργικά απαραίτητες για το σχηματισμό του καψιδίου, την αναπαραγωγή, τη διακυτταρική μετακίνηση, και τη μετάδοση μέσω φορέων. Παρουσιάζουν μια μοναδική ικανότητα να εισβάλλουν, να αναπαράγονται και να χρησιμοποιούν τις απαραίτητες χημικές ενώσεις, τα κατάλληλα ενζυμικά συστήματα και τα αναγκαία οργανίδια των φυτικών κυττάρων για τη διαίωσή τους. Προκαλούν σημαντικές φυσιολογικές και μορφολογικές αλλοιώσεις στα φυτά που μεταφράζονται, συνήθως, στην εκδήλωση συμπτωμάτων και οδηγούν στη μείωση ή στην υποβάθμιση της γεωργικής παραγωγής. Τέτοια συμπτώματα αφορούν συχνά την εμφάνιση μωσαϊκών, μεταχρωματισμών, ποικιλοχλωρώσεων, νεκρώσεων, κηλιδώσεων, ικτέρων, κτλ. Η μετάδοση των ιών από φυτό σε φυτό επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους και μηχανισμούς ανάλογα με τον κάθε ιό. Οι κυριότεροι τρόποι περιλαμβάνουν τη μετάδοση με την επαφή, τη μεσολάβηση φορέων (όπως έντομα, ακάρεα, νηματώδεις, μύκητες, παρασιτικά φυτά), τον σπόρο, τη γύρη και το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό. Η ακριβής ταυτοποίησή τους γίνεται με βιοδοκιμές τεχνητών μολύνσεων σε ειδικούς φυτοδείκτες, καθώς και με τη χρησιμοποίηση σύγχρονων εργαστηριακών δοκιμών (ορολογικές και μοριακές).

Τα **ιοειδή** είναι μικροσκοπικά μόρια RNA μονής αλυσίδας και το μέγεθος του γενώματος τους κυμαίνεται από 246-401 νουκλεοτίδια. Έχουν πολύ μικρότερο μέγεθος από τους ιούς και είναι ομοιοπολικά κλειστά μόρια με κυκλική δομή. Σε αντίθεση με τους ιούς δεν περιβάλλονται από πρωτεϊνικό καψίδιο αφού το υπερ-μικροσκοπικό τους μέγεθος δεν επιτρέπει την κωδικοποίηση και την παραγωγή οποιασδήποτε πρωτεΐνης. Εκτιμάται ότι η εξελικτική τους πορεία είναι πρωτόγονη και ανεξάρτητη από τους ιούς, ενώ σε αρκετές μελέτες αποκαλούνται και ζωντανά απολιθώματα ενός προ-κυτταρικού κόσμου (Diener, 2001). Παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ενδομοριακής συμπληρωματικότητας και κατ' επέκταση δευτεροταγούς RNA δομής, γεγονός που ευθύνεται για τις πολύπλοκες αναδιπλώσεις που φέρει το μόριο του ιοειδούς στο χώρο. Η υψηλή δευτεροταγής δομή καθιστά το μόριό τους πολύ σταθερό. Πολλαπλασιάζονται αυτόνομα υιοθετώντας μηχανισμούς κυλιόμενου κύκλου

(rolling circle, RC) και παρεμβαίνουν στους μηχανισμούς μεταγραφής των φυτικών κυττάρων. Η αναπαραγωγή τους βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη συμμετοχή του γενετικού υλικού των φυτών ξενιστών. Αυτό οδηγεί στην πρόκληση παρόμοιων συμπτωμάτων με εκείνα των φυτικών ιών και εκδηλώνονται με μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές μεταβολές στους ιστούς των φυτών. Η ένταση και το είδος των συμπτωμάτων προσβολής από τα ιοειδή εξαρτώνται από το είδος και την ευπάθεια του ξενιστή και, συνήθως, περιλαμβάνουν την εμφάνιση μεταχρωματισμών, ποικιλοχλωρώσεων, νεκρώσεων, παραμορφώσεων οργάνων του φυτού, ικτέρων, κτλ. Υπάρχουν ωστόσο και περιπτώσεις όπου η προσβολή από τα ιοειδή δεν οδηγεί στην εκδήλωση συμπτωμάτων και το φυτό ξενιστής παρουσιάζει λανθάνουσα μόλυνση. Η μετάδοση των ιοειδών γίνεται, κυρίως, με μηχανικά μέσα, καθώς και με τον εμβολιασμό μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Η ανίχνευση των ιοειδών γίνεται με βιοδοκιμές σε πλώδεις ή δεντρώδεις φυτοδείκτες, ενώ ευρεία εφαρμογή βρίσκουν οι μοριακές εργαστηριακές δοκιμές. Σημειώνεται ότι η χρήση ορολογικών δοκιμών που στοχεύουν στον ανοσολογικό προσδιορισμό πρωτεϊνικών αντιγόνων (π.χ. ανοσοδιαγνωστική δοκιμή ELISA) δεν μπορεί να εφαρμοστεί ως διαγνωστικό μέσο, αφού τα ιοειδή δεν κωδικοποιούν την παραγωγή πρωτεϊνών.

Ταξινόμηση και ονοματολογία ιοειδών

Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί 30 διαφορετικά είδη ιοειδών σε ποικίλους ξενιστές (Πίνακας 1). Πρόσφατα, η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) έχει ταξινομήσει τα ιοειδή σε δύο οικογένειες (Flores *et al.*, 2004):

- A. Οικογένεια ***Pospiviroidae***: Απαρτίζεται από 5 γένη (*Pospiviroid*, *Hostuviroid*, *Cocadviroid*, *Apscaviroid* και *Coleviroid*) στα οποία εντάσσονται 26 είδη ιοειδών. Τα μέλη της οικογένειας χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας κεντρικής συντηρημένης περιοχής και τον πολλαπλασιασμό στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων. Στην οικογένεια κατατάσσονται τα περισσότερα ιοειδή.
- B. Οικογένεια ***Avsunviroidae***: Η οικογένεια αποτελείται από 3 γένη (*Avsunviroid*, *Pelamoviroid* και *Elaviroid*) στα οποία κατατάσσονται μόλις 4 ιοειδή. Τα ιοειδή που περιλαμβάνει χαρακτηρίζονται από την απουσία της κεντρικής συντηρημένης περιοχής, ενώ ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται στους χλωροπλάστες των κυττάρων.

Η ονοματολογία των ιοειδών είναι παρόμοια με εκείνη των φυτικών ιών. Στηρίζεται στο αγγλικό τριώνυμο του οποίου η πρώτη λέξη αναφέρει τον ξενιστή στον οποίο αναφέρθηκε για πρώτη φορά το παθογόνο, η δεύτερη περιγράφει τα συμπτώματα που προκαλεί και η τρίτη το παθογόνο (viroid), αποτυπωμένα με πλάγιους χαρακτήρες (*italics*). Για παράδειγμα, σύμφωνα με τον οργανισμό ICTV, η επιστημονική ονομασία του ιοειδούς των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας που αποτελεί και το τυπικό μέλος της οικογένειας *Pospiviroidae*, είναι *Potato spindle tuber viroid*, και για τη συντομογραφία του χρησιμοποιούνται τα αρχικά PSTVd (σε όρθια γραμμή).

Πίνακας 1. Ονοματολογία, ταξινόμηση κατάταξη και ξενιστές των κυριότερων ιοειδών που έχουν αναφερθεί σε διεθνές επίπεδο

Οικογένεια <i>Pospiviroidae</i>				
Γένος	Είδος	Ακρονόμιο	Κύριοι Ξενιστές	
<i>Pospiviroid</i>	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	PSTVd	Πατάτα, Λαχανοκομικά (Τομάτα), Καλλωπιστικά	
	<i>Citrus exocortis viroid</i>	CEVd	Εσπεριδοειδή, Λαχανικά, Αμπέλια, κ.ά	
	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	CSVd	Χρυσάνθεμα	
	<i>Tomato apical stunt viroid</i>	TASVd	Τομάτα	
<i>Hostuviroid</i>	<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	TCDVd	Τομάτα	
	<i>Columnea latent viroid</i>	CLVd	Κολουμνέα	
	<i>Mexican papita viroid</i>	MPVd	Τομάτα	
	<i>Hop stunt viroid</i> (Στα εσπεριδοειδή ήταν γνωστό και ως ιοειδής της καρχήζας ή ιοειδής 2)	HSVd	Λυκίσκος, Εσπεριδοειδή, Πυρηνόκαρπα, Αμπέλια, Συκιά, Ροδιά, Λαχανικά, Καλλωπιστικά, κ.ά.	
<i>Apscaviroid</i>	<i>Citrus bent leaf viroid</i> (γνωστό και ως ιοειδής 1)	CBLVd	Εσπεριδοειδή	
	<i>Citrus dwarfing viroid</i> (γνωστό και ως ιοειδής 3)	CDVd	Εσπεριδοειδή	
	<i>Citrus viroid V</i>	CVd-V	Εσπεριδοειδή	
	<i>Citrus viroid VI</i>	CVd-VI	Εσπεριδοειδή	
<i>Coleuviroid</i>	<i>Grapevine yellow speckle viroids -I,- 2</i>	GYSVd-1, -2	Αμπέλια	
	<i>Australian grapevine viroid</i>	AGVd	Αμπέλια	
	<i>Apple dimple fruit viroid</i>	ADFVd	Μηλοειδή	
	<i>Apple scar skin viroid</i>	ASSVd	Μηλοειδή	
	<i>Apple fruit crinkle viroid</i>	AFCVd	Μηλοειδή	
	<i>Pear blister canker viroid</i>	PBCVd	Αχλαδιά, Κυδωνιά	
	<i>Coleus blumei viroid-1, -2, -3</i>	CBVd-1, -2, -3	Κολός (Ωραιόφυλλο), Μέντα, Βασιλικός, Μέλισσα	
	<i>Citrus bark cracking viroid</i> (γνωστό και ως ιοειδής 4)	CBCVd	Εσπεριδοειδή	
	<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>	CCCVd	Κοκκοφοϊνικός	
	<i>Coconut tinangaja viroid</i>	CTVd	Κοκκοφοϊνικός	
<i>Cocadviroid</i>				
<i>Οικογένεια Avsunviroidae</i>				
<i>Avsunviroid</i>	<i>Avocado sunblotch viroid</i>	ASBVd	Αβοκάντο	
	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>	CCMVd	Χρυσάνθεμο	
<i>Pelamoviroid</i>	<i>Peach latent mosaic viroid</i>	PLMVd	Ροδακινιά, Νεκταρινιά	
	<i>Eggplant latent viroid</i>	ELVd	Μελιτζάνα	

Εύρος ξενιστών και συμπτώματα

Το εύρος ξενιστών των ιοειδών ποικίλλει ανάλογα με το είδος του παθογόνου. Ορισμένα είδη προσβάλλουν ένα μόνο φυτικό γένος (π.χ. *Grapevine yellow speckle viroid* και *Citrus bent leaf viroid*), ενώ άλλα έχουν πολλούς ξενιστές (π.χ. *Hop stunt viroid* και *Citrus exocortis viroid*). Τα ιοειδή μέλη της οικογένειας *Pospiviroidae* έχουν σαφώς πιο μεγάλο εύρος ξενιστών από εκείνα που κατατάσσονται στην οικογένεια *Ausunviroidae*. Αντίστοιχα, το είδος και η ένταση των συμπτωμάτων που προκαλούν ποικίλλει ανάλογα με το είδος και στέλεχος του παθογόνου, το είδος, την ποικιλία, την ευπάθεια και την ευρωστία του φυτού ξενιστή, τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν, αλλά και την ταυτόχρονη μόλυνση με άλλα φυτοπαθογόνα όπως ιοί, μύκητες και βακτήρια. Ο τύπος των συμπτωμάτων που προκαλούν τα ιοειδή συνήθως παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με εκείνα των φυτικών ιών. Η μόλυνση από ιοειδή μπορεί να προκαλέσει νανισμό, καχεκτική ανάπτυξη, ξήρανση και νέκρωση των φυτών, χλωρίωση, κηλιδώσεις, επιναστία και παραμόρφωση των φύλλων, βοθρίωση και μείωση των μεσογονάτιων διαστημάτων των στελεχών και των βλαστών, ράγισμα, αποφλοίωση, έλκη και εκροή κόμμεως στον βλαστό ή τον κορμό, μείωση της παραγωγής και μεταχρωματισμό των ανθέων, παραμορφώσεις φυτικών ιστών και οργάνων (**Εικόνες 1 και 2**). Υπάρχουν ωστόσο περιπτώσεις στις οποίες η μόλυνση περνά απαρατήρητη χωρίς να εκδηλώνονται ορατά συμπτώματα (λανθάνουσα μόλυνση). Η απουσία συμπτωμάτων είναι συνήθης σε αυτοφυείς ξενιστές που μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και διάδοση του παθογόνου στα καλλιεργούμενα είδη. Σε γενικές γραμμές ο πολλαπλασιασμός και η εκδήλωση συμπτωμάτων στα ιοειδή ευνοούνται από την υψηλή θερμοκρασία, καθώς και την υψηλή ένταση του φωτός με αποτέλεσμα τα συμπτώματα να είναι εντονότερα κατά τις θερμές και φωτεινές περιόδους του έτους (Singh *et al.*, 2003).



Εικόνα 1. Συμπτώματα προσβολής ιοειδών σε εσπεριδοειδή α, β. Ασυμφωνία υποκειμένου εμβολίου λόγω προσβολής από το ιοειδές της εξωκόρτιδας (CEVd). γ. Συμπτώματα βοθρίωσης ως αποτέλεσμα μόλυνσης από το στέλεχος του ιοειδούς HSVd που προκαλεί την ασθένεια της καχεξίας



Εικόνα 2. Συμπτώματα ατρακτοειδούς εμφάνισης των κονδύλων της πατάτας

Τρόποι μετάδοσης των ιοειδών

Τα ιοειδή, όπως άλλωστε και όλα τα φυτοπαθογόνα, μεταδίδονται με τον αγενή πολλαπλασιασμό των φυτών, όπως με τη χρήση μολυσμένων εμβολίων ή υποκειμένων. Τα ιοειδή επίσης μεταδίδονται με μηχανικό τρόπο στα φυτά ξενιστές. Η μηχανική μετάδοση αναφέρεται στην είσοδο του παθογόνου στο φυτό μέσα από ρήγματα των μεμβρανών των φυτικών κυττάρων, που προκαλούνται από πληγές στην επιφάνειά τους. Στη φύση τα ιοειδή συνήθως μεταδίδονται μηχανικά κατά την επαφή των γειτονικών φυτών (τριβή των φύλλων), καθώς και με μολυσμένα εργαλεία, ρούχα, παπούτσια και χέρια καλλιεργητών κατά τη διάρκεια των καλλιεργητικών εργασιών, ακόμη και με ζώα. Όπως έχει αναφερθεί, η αναδιπλωμένη μορφή του μορίου των ιοειδών, τους προσδίδει μεγάλη ανθεκτικότητα με αποτέλεσμα να παραμένουν μολυσματικά σε διάφορες επιφάνειες για μεγάλο χρονικό διάστημα (εβδομάδες μέχρι μήνες, ανάλογα με το είδος του ιοειδούς). Μελέτες έδειξαν ότι το PSTVd μπορεί να μεταδοθεί με τον σπόρο καθώς και τη γύρη, και επιβιώνει στην επιφάνεια του σπόρου για μακρύ χρονικό διάστημα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταγραφεί για το ASBVd στο αβοκάντο όπου η μετάδοση με τη γύρη και το σπόρο αποτελεί σημαντικό παράγοντα εξάπλωσης της ασθένειας. Τέλος, για δύο ιοειδή που προσβάλλουν την ντομάτα (TASVd και TPMVd) έχει αναφερθεί μετάδοση με αφίδες, κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (Flores *et al.*, 2005).

Διάγνωση των Ιοειδών

Η διάγνωση των ιοειδών στηρίζεται, κυρίως, στο συνδυασμό βιοδοκιμών σε ειδικούς φυτοδείκτες και μοριακών τεχνικών. Δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ορολογικές διαγνωστικές τεχνικές (π.χ. ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA), εξαιτίας της απουσίας πρωτεϊνικού καψιδίου από το μόριό τους.

α. Βιοδοκιμές

Η χρήση φυτών δεικτών αποτελεί μια από τις παλαιότερες διαγνωστικές τεχνικές των φυτικών παθογόνων. Στηρίζεται στην τεχνητή μόλυνση συγκεκριμένων φυτών και στην παρατήρηση της πιθανής ανάπτυξης συμπτωμάτων. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα για οπτική παρατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας του παθογόνου όπως η ικανότητα μετάδοσης, αναπαραγωγής στο φυτό και παραγωγής συμπτωμάτων (**Εικόνα 3**). Το μειονέκτημα των βιοδοκιμών είναι το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την εμφάνιση των συμπτωμάτων, καθώς και η ανάγκη για προσεκτική φροντίδα των φυτών σε ειδικό θερμοκηπιακό χώρο, καθώς είναι δυνατόν να υπάρξει ταυτόχρονη μόλυνση με άλλους ιούς και η λήψη συγκεχυμένων συμπερασμάτων. Όσον αφορά την εφαρμογή βιοδοκιμών για την ανίχνευση ιοειδών οι κυριότεροι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή των κατάλληλων φυτοδεικτών είναι η αξιοπιστία στην αναγνώριση των συμπτωμάτων που προκαλούνται, η χρονική διάρκεια που απαιτείται για την εκδήλωση των συμπτωμάτων, η διαφοροποίηση στην ένταση των συμπτωμάτων, η



Εικόνα 3. Παραγωγή φυτών δεικτών, εμφολιασμός και εμφάνιση συμπτωμάτων στο φυτοδείκτη της κίτριάς μετά από μόλυνση με το CEVd

ευαισθησία, οι πιθανές περιβαλλοντικές επιδράσεις στην εκδήλωση συμπτωμάτων, η διαφοροποίηση από τυχόν μικτή ύπαρξη περισσότερων παθογόνων στο υπό έλεγχο φυτό (πχ. άλλα ιοειδή ή ιοί) και τέλος ο αριθμός των υπό έλεγχο δειγμάτων και το κόστος (Roistacher, 1991).

β. Μοριακές δοκιμές

Η αλματώδης πρόοδος των βιολογικών επιστημών, σε συνδυασμό με τις νέες τεχνολογίες, οδήγησαν τα τελευταία χρόνια την επιστήμη της φυτοπροστασίας σε νέες κατευθύνσεις. Καινοτόμες τεχνολογίες που βασίζονται στην ανάλυση και τη μελέτη των νουκλεϊκών οξέων συμβάλλουν σήμερα στην ταχεία και αξιόπιστη διάγνωση φυτικών ασθενειών. Η πρώτη εργαστηριακή τεχνική που είχε ευρεία εφαρμογή κατά τις δεκαετίες 1970 και 1980 ήταν η ανάλυση του υπό έλεγχο RNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με διάφορες παραλλαγές ώστε να γινόταν δυνατή η ταυτοποίηση της παρουσίας και των μοριακών χαρακτηριστικών του ιοειδούς-στόχου. Ο μοριακός υβριδισμός αποτελεί μια μέθοδο που είχε εφαρμοστεί με ιδιαίτερη επιτυχία κατά την περίοδο 1980-1990 για την ταυτοποίηση ιοειδών. Περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση ενός συνθετικού μορίου με συμπληρωματική δομή προς το υπό μελέτη ιοειδές και ειδική σήμανση, κατά τρόπο ώστε να προσκολλάται στον στόχο και να δίνει θετική αντίδραση στην περίπτωση επιτυχούς πρόσδεσης στο νουκλεϊνικό οξύ (**Εικόνα 4**).

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, σε συνδυασμό με την αντίστροφη μεταγραφή των RNA στόχων είναι μια εργαστηριακή τεχνική, η οποία παρέχει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού ενός μορίου DNA σε πολλά πανομοιότυπα αντίγραφα ώστε να καταστεί δυνατή η ανίχνευση του (Mullis *et al.*, 1987). Η τεχνική αυτή, παρόλο που αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της Μοριακής Βιολογίας, χρησιμοποιείται πια και από την επιστήμη της Φυτοπαθολογίας για τη διάγνωση των ιοειδών με ταχύτητα, ευαισθησία και αξιοπιστία. Επιπλέον, παρέχει τη δυνατότητα για τον προσδιορισμό των στελεχών, τη μελέτη των νουκλεϊνικών οξέων, τη φυλογενετική ανάλυση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των ιοειδών

Αντιμετώπιση των ιοειδών

Ο αποτελεσματικότερος τρόπος για την αντιμετώπιση των ιοειδών είναι η αποφυγή της μόλυνσης, η οποία προϋποθέτει τη χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (δενδρυλλίων, εμβολίων, υποκειμένων, μοσχευμάτων, σπόρων, κονδύλων, κτλ.). Η διάδοση και η χρησιμοποίηση φυτικού υλικού απαλλαγμένου από φυτοπαθογόνα αποτελεί τη θεμελιώδη πρακτική και τη βάση για την αντιμετώπιση όλων των φυτικών ασθενειών. Είναι γνωστό ότι οι ιοί και τα ιοειδή δεν μπορούν να καταπολεμηθούν με χημικά μέσα. Ειδικά για τα ιοειδή των οποίων η μετάδοση γίνεται, κυρίως, με τη διακίνηση μολυσμένου αγενούς πολλαπλασιαστικού υλικού, η χρήση υγιούς και πιστοποιημένου υλικού συμβάλλει θετικά στην πρόληψη και την αποφυγή εισόδου του παθογόνου σε φυτείες ή αγρούς. Επιπλέον, η λήψη μέτρων υγιεινής όπως η απομάκρυνση ασθενών ή ύποπτων φυτών, η χρήση γαντιών και η απολύμανση των καλλιεργητικών και κοπτικών εργαλείων με εμβάπτιση σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 10% ενδιάμεσα της χρήσης τους από φυτό σε φυτό, μειώνει τις πιθανότητες μετάδοσης των ιοειδών.



Εικόνα 4. Εργαστηριακή διαδικασία για την ανίχνευση ιοειδών με τη χρήση μοριακών δοκιμών

Σε αρκετές περιπτώσεις η προστασία των καλλιεργειών από ορισμένα ιοειδή διασφαλίζεται μέσα από αυστηρές ευρωπαϊκές ή εθνικές νομοθεσίες ή άλλα φυτοϋγειονομικά μέτρα προκειμένου να διασφαλιστεί η αποφυγή διάδοσης των παθογόνων ιοειδών καραντίνας (όπως π.χ. PSTVd, CSVd), καθώς και η εξάλειψή τους στην περίπτωση που εντοπιστούν σε μια περιοχή.

Η εφαρμογή σύγχρονων βιοτεχνολογικών μεθόδων για την εξυγίανση προσβεβλημένων φυτών και την αξιόπιστη διάγνωση των ιοειδών τυγχάνει ευρείας χρήσης από τους ερευνητές σε διάφορες χώρες. Στο Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών εφαρμόζονται, κατά τα τελευταία τριάντα χρόνια, προγράμματα παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού των κυριότερων δενδρωδών καλλιεργειών της Κύπρου όπως αμπέλια, εσπεριδοειδή και πυρηνόκαρπα με κύριο στόχο την παραγωγή, τη διατήρηση και τη διάθεση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού αξιόλογων παραδοσιακών και εισαγόμενων ποικιλιών. Σε αυτό το πλαίσιο, στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις του ΙΓΕ γίνεται εξυγίανση των μολυσμένων δενδρυλλίων με τον συνδυασμό σύγχρονων τεχνικών θερμοθεραπείας/κρυοθεραπείας, μεριστωματικής καλλιέργειας, μικροεμβολιασμού και χημειοθεραπείας.

Ανασκόπηση της Ερευνητικής Εργασίας του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών για τα ιοειδή

Ο Κλάδος Φυτοπροστασίας του ΙΓΕ από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 συμμετείχε σε εθνικά, διακρατικά και ευρωπαϊκά ερευνητικά προγράμματα καθώς και άλλες ερευνητικές δραστηριότητες για τα ιοειδή.

A. Επισκόπηση εσπεριδοειδών για την παρουσία ιοειδών

Η διερεύνηση της παρουσίας της εξοκόρτιδας στις καλλιέργειες εσπεριδοειδών της Κύπρου ήταν η πρώτη ερευνητική εργασία του Κλάδου Φυτοπροστασίας του ΙΓΕ σχετικά με τα ιοειδή στην Κύπρο. Πραγματοποιήθηκε μεταξύ 1987-1990 και αφορούσε τη συλλογή φυτικού υλικού από τις κυριότερες περιοχές καλλιέργειας εσπεριδοειδών και τον ιολογικό του έλεγχο με τη βιολογική μέθοδο του εμβολιασμού σε φυτοδείκτες (Κυριακού, 1992). Συνολικά συλλέχθηκαν 573 δείγματα από 25 είδη και ποικιλίες λεμονιάς, πορτοκαλιάς, γκρέιπφρουτ, μανταρινιάς, λάιμ και κουκκούατ. Από τα δείγματα έγινε εμβολιασμός τεσσάρων οφθαλμών σε φυτοδείκτες κιτριάς (Etrog citron, Arizona 861), που αποτελεί μέχρι και σήμερα έναν ιδιαίτερα αποτελεσματικό δείκτη για την ανίχνευση ιοειδών. Ακολούθως τα εμβολιασμένα δέντρα κιτριάς διατηρήθηκαν σε γλάστρες μέσα σε ειδικό γυάλινο θερμοκήπιο για 9 τουλάχιστον μήνες με συνεχή παρατήρηση και καταγραφή συμπτωμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 506 από τα 573 δέντρα που ελέγχθηκαν (ποσοστό 88,3) ήταν θετικά στο CEVd σύμφωνα με την εκδήλωση συμπτωμάτων στα φυτά δείκτες. Τα συμπτώματα που είχαν προκληθεί κυμαίνονταν από πολύ σοβαρά μέχρι πολύ ήπια. Τα σοβαρά συμπτώματα περιελάμβαναν νέκρωση μίσχου και νευρώσεων στα φύλλα, επιναστία, τραχύτητα ελάσματος, καθώς και νανισμό των φυτών, συμπτώματα που θεωρούνταν χαρακτηριστικά του CEVd. Τα ηπιότερα συμπτώματα περιελάμβαναν μελάνωση του μίσχου των φύλλων, ελαφριά επιναστία και ελαφρύ νανισμό. Τα ήπια συμπτώματα ενδέχεται να οφείλονταν σε διαφορετικά στελέχη του CEVd ή και σε άλλα ιοειδή. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις που λήφθηκαν, τα συμπτώματα εμφανίζονταν σε μικρότερο χρονικό διάστημα όταν ο εμβολιασμός των φυτών γινόταν κατά τον Μάιο-Ιούνιο. Γενικά πιστεύεται ότι η θερμή περίοδος του έτους είναι καταλληλότερη για την εφαρμογή διαγνωστικών μεθόδων για τα ιοειδή καθότι ευνοείται ο πολλαπλασιασμός τους στα φυτικά κύτταρα, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τους φυτικούς ιούς, των οποίων η συγκέντρωση μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Κυριακού, 1992).

Η διερεύνηση της συχνότητας εμφάνισης ιοειδών στις δεντρώδεις καλλιέργειες συνεχίστηκε με την εφαρμογή πιο σύγχρονων διαγνωστικών τεχνικών που αποτελούν επιτεύγματα της μοριακής βιολογίας και βιοτεχνολογίας. Με τη χρησιμοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής και της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Reverse Transcription, Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) και τη συμπερίληψη μοριακών διαγνωστικών πρωτοκόλλων που ανιχνεύουν και άλλα ιοειδή, διερευνήθηκε η παρουσία των CEVd, HSVd, CBLVd, CDVd, CBCVd και CVd-V. Μεταξύ 2012 και 2015 πραγματοποιήθηκε συλλογή και εργαστηριακός έλεγχος σε 700 περίπου δείγματα από κιτρομηλιές, πορτοκαλιές, μανταρινιές, λεμονιές, καθώς και άλλα εσπεριδοειδή από διάφορες περιοχές καλλιέργειας της Κύπρου. Τα αποτελέσματα

δεικνύουν την ευρεία διάδοση της εξοκόρτιδας (CEVd) με ποσοστό 80% σε όλα τα είδη και ποικιλίες που ελέγχθηκαν, καθώς και του HSVd που ακολουθεί με ποσοστό 54% επί του συνόλου των δειγμάτων. Μικρότερη εντοπίζεται να είναι η παρουσία των ιοειδών CBLVd, CDVd, CBCVd που ανιχνεύονται σε ποσοστά 13%, 9,5% και 7% αντίστοιχα. Δεν ταυτοποιήθηκε το ιοειδές 5 που μέχρι στιγμής εντοπίζεται κυρίως στην Αμερική (**Πίνακας 2**) (Παπαγιάννης και Καπαρή-Ησαΐα, 2014). Παρά την ευρεία διάδοση του CEVd αλλά και του HSVd, εκτιμάται ότι οι επιπτώσεις στην παραγωγή είναι ασήμαντες εξαιτίας της χρήσης του ανθεκτικού υποκειμένου της κитρομηλιάς.

B. Ανάπτυξη νέων διαγνωστικών δοκιμών για την ανίχνευση ιοειδών

Η χρήση φυτοδεικτών για τη διάγνωση των ιοειδών αποτελεί μία σημαντική μέθοδο για την ανίχνευση των ιοειδών. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η αξιοπιστία και η καταγραφή της ικανότητας του παθογόνου να μολύνει με επιτυχία τον ξενιστή και να αναπαράγει τα συμπτώματα. Ωστόσο μειονεκτεί σημαντικά στον χρόνο που απαιτείται για την εμφάνιση των συμπτωμάτων, και τη λήψη των αποτελεσμάτων. Σε αυτό το πλαίσιο, στα Εργαστήρια Εξυγίανσης, του Κλάδου Φυτοπροστασίας αναπτύχθηκε πρόσφατα μια νέα εργαστηριακή τεχνική που συνδυάζει τον μικροεμβολιασμό *in vitro* (στον σωλήνα) και τον βιολογικό έλεγχο με φυτά δείκτες για την ανίχνευση του CEVd καθώς και άλλων ιοειδών. Ειδικότερα, στην τεχνική γίνεται εμβολιασμός μικρών τεμαχίων από το υπό εξέταση δείγμα σε φυτάρια κитριάς (*Ettrog citron*) που έχουν αναπτυχθεί σε μικροσωλήνα κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Στην περίπτωση που το δείγμα είναι μολυσμένο με ένα ή περισσότερα ιοειδή, παρατηρείται η εμφάνιση συμπτωμάτων στα μικρόφυτα σε διάστημα μερικών ημερών (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5. Διαδικασία ιστοκαλλιέργειας και μικροεμβολισμού σε σωλήνα για την εξυγίανση από ιοειδή και άλλες ιολογικές ασθένειες

Πίνακας 2. Συχνότητα εμφάνισης ιοειδών στις καλλιέργειες εσπεριδοειδών της Κύπρου

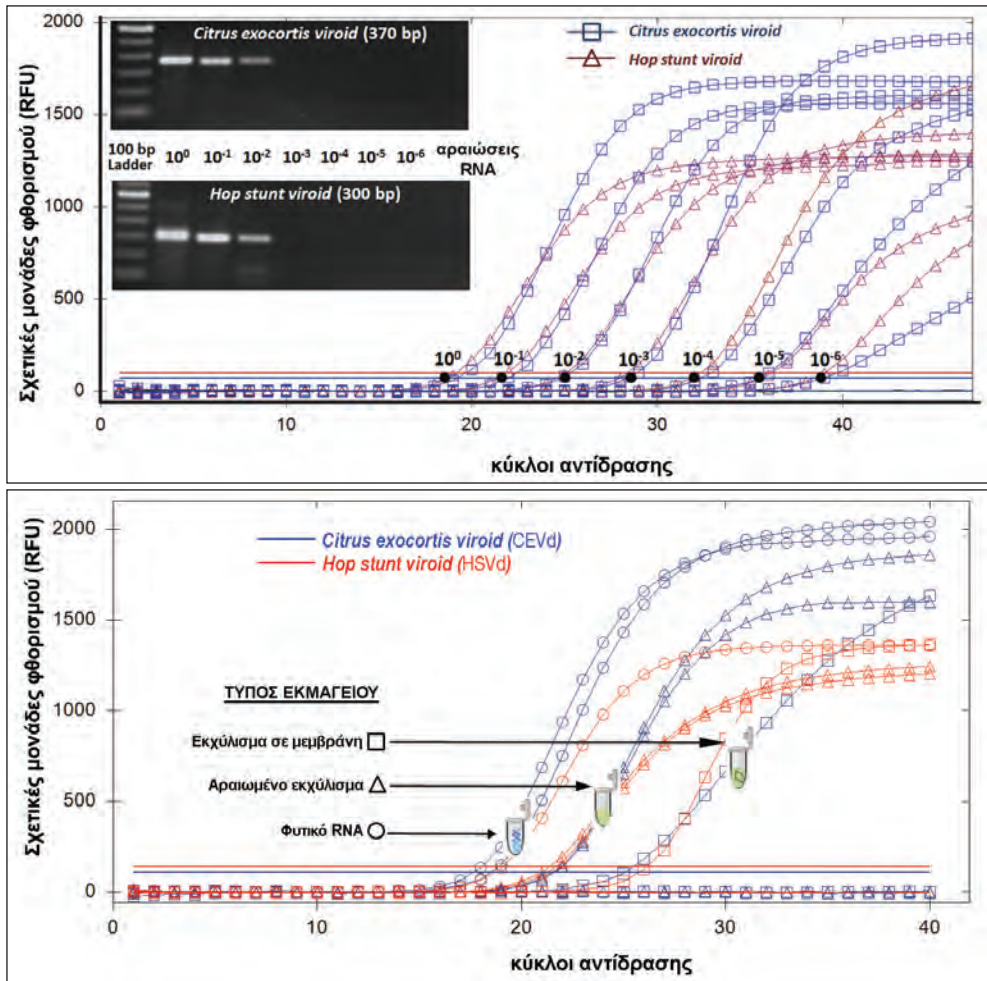
Είδος	Ποικιλία	Αρ. δειγμάτων	CEVd	HSVd	CBLVd	CDVd	CBCVd
<i>Citrus aurantifolium</i> (Κιτρομηλιά)		118	106	81	13	17	5
<i>C. sinensis</i> (Πορτοκαλιά)	Γιάφα	83	61	38	7	5	6
	Αμιατούσικη	3	3	3	0	3	1
	Στεκκέρικο	12	9	2	0	0	2
	Βαλέντσια	93	57	42	9	0	3
	Ουάσιγκτον Νάβελ	45	25	16	5	0	2
<i>C. reticulata</i> (Μανταρινιά)	Αρακαπός	55	46	27	5	7	1
<i>C. deliciosa</i> (Μανταρινιά)	Κλημεντίνη	73	57	40	6	5	1
<i>C. limon</i> (Λεμονιά)	Πολύφορη	122	95	71	28	15	18
	Λαπήθου	16	14	3	2	0	0
<i>C. grantis</i> (Φράππα)	Φράππα	9	8	7	0	0	2
<i>C. maxima</i>	Πόμελο	11	11	7	3	0	1
<i>C. japonica</i> (Κουμκουάτ)		74	60	49	15	16	8
	ΣΥΝΟΛΟ	714	570	386	93	68	50
	% Προσβολής		79.8	54	13	9.5	7

Η μέθοδος, συνδυαζόμενη με τη χρήση της RT-PCR μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα που δεν ξεπερνά τις δύο εβδομάδες σε αντίθεση με την παραδοσιακή μέθοδο του εμβολιασμού στο θερμοκήπιο που απαιτεί τουλάχιστον 9 μήνες για την εμφάνιση συμπτωμάτων (Karagi-Isaia *et al.*, 2008).

Στα Εργαστήρια Μοριακής Φυτοπαθολογίας, του Κλάδου Φυτοπροστασίας του ΙΓΕ αναπτύχθηκε πρόσφατα μια νέα τεχνική για την ταυτόχρονη ανίχνευση των ιοειδών *Citrus exocortis viroid* (CEVd) και *Hop stunt viroid* (HSVd). Η μέθοδος χρησιμοποιεί δύο ζεύγη εκκινητών και δύο μοριακούς ανιχνευτές υδρόλυσης τύπου TaqMan® για την ανίχνευση των δύο παθογόνων, σχεδιασμένους κατά τέτοιο τρόπο ώστε, να υβριδοποιούνται και να δίνουν διαφορετικό φθορισμό για τον κάθε στόχο, επιτυγχάνοντας έτσι την ταυτόχρονη ανίχνευσή τους σε μία αντίδραση. Η νέα αυτή τεχνική αξιολογήθηκε με επιτυχία σε διάφορες απομονώσεις που προήλθαν από εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα αμπέλια και άλλα δεντροκομικά είδη τόσο από την Κύπρο όσο και από άλλες περιοχές της μεσογειακής λεκάνης. Τα αποτελέσματά της ήταν συγκρίσιμα με αυτά από δημοσιευμένα εργαστηριακά πρωτόκολλα συμβατικής RT-PCR (Ito *et al.*, 2000), ενώ παράλληλα ήταν κατά 1000 φορές πιο ευαίσθητη. Ο υψηλός βαθμός ευαισθησίας της μεθόδου έδωσε τη δυνατότητα εφαρμογής πιο απλοποιημένων τεχνικών χειρισμού των φυτικών δειγμάτων και παρασκευής εκμαγείου. Οι τεχνικές αυτές αναφέρονται είτε στην αποτύπωση φυτικού εκχυλίσματος σε νάιλον μεμβράνη και έκλουση, ή στην απευθείας χρήση αραιωμένου φυτικού εκχυλίσματος στο μίγμα αντίδρασης (**Εικόνα 6**). Η μέθοδος δίνει τη δυνατότητα για έγκαιρη και ορθή ανίχνευση, καθώς και για ποσοτικοποίηση των δύο παθογόνων στους ιστούς των ξενιστών. Η υιοθέτηση της νέας εργαστηριακής δοκιμής εκτιμάται ότι θα συμβάλει στον αποτελεσματικότερο φυτοπαθολογικό έλεγχο του πολλαπλασιαστικού υλικού και στην πρόληψη της διάδοσης των δύο ασθeneιών, ειδικά στις καλλιέργειες των εσπεριδοειδών (Papaγιαννίς, 2014).

Γ. Επίδραση ιοειδών στα φυτά ξενιστές

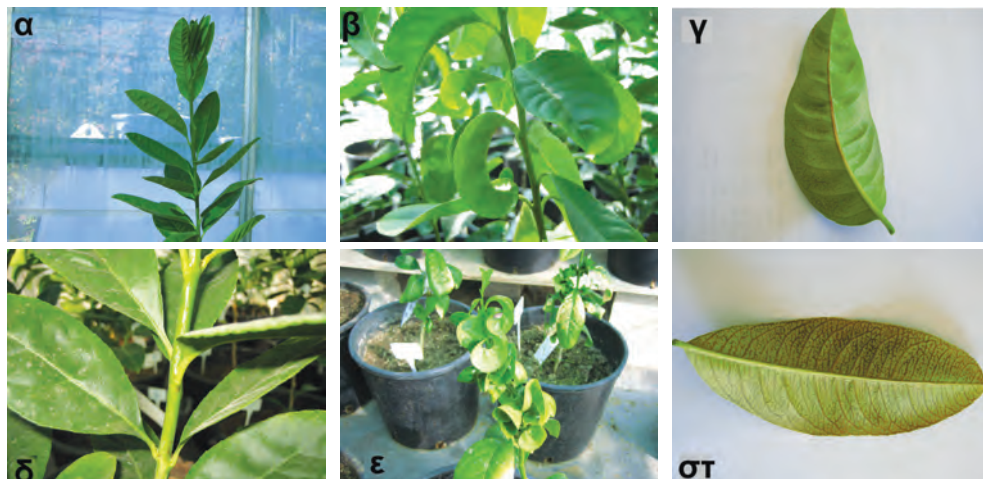
Στο πλαίσιο της εργασίας διερευνήθηκε η επίδραση των ιοειδών CEVd και HSVd στην ανάπτυξη της κόμης, στην ποσότητα και την ποιότητα παραγωγής της λεμονιάς Λαπήθου. Για τον σκοπό αυτό την Άνοιξη του 1995, προσβεβλημένα και υγιή δενδρύλλια λεμονιάς εμβολιασμένα σε υποκείμενο κιτρομηλιάς φυτεύτηκαν στον πειραματικό σταθμό Ζυγίου σε σχέδιο τυχαιοποιημένων ομάδων. Η επεξεργασία των δεδομένων έδειξε ότι τόσο η ανάπτυξη όσο και η παραγωγή των προσβεβλημένων δέντρων, επηρεάστηκαν αρνητικά από την παρουσία των ιοειδών. Δέκα χρόνια μετά τη φύτευση των δέντρων η περιφέρεια του κεντρικού κορμού, το ύψος και ο όγκος της κόμης στα προσβεβλημένα με ιοειδή σε σχέση με τα υγιή δέντρα, μειώθηκαν κατά 14%, 14% και 30%, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, ο συνολικός αριθμός των παραγόμενων καρπών και η συνολική παραγωγή των προσβεβλημένων δέντρων ήταν κατά 40% και 42% μειωμένη σε σχέση με τα υγιή. Το μέγεθος του καρπού καθώς και η περιεκτικότητα του καρπού σε χυμό δεν επηρεάστηκαν από την προσβολή. Ωστόσο τόσο τα ολικά διαλυτά στερεά όσο και τα οξέα παρουσίασαν σημαντική μείωση στα μολυσμένα δέντρα σε σχέση με τα υγιή (Kyriakiou *et al.*, 2004).



Εικόνα 6. Καμπύλες ενίσχυσης του RNA των ιοειδών CEVd και HSVd με τη μέθοδο της RT-PCR πραγματικού χρόνου που αναπτύχθηκε στα εργαστήρια φυτοπαθολογίας του ΙΓΕ και δίνει την δυνατότητα για αυξημένη ευαισθησία και χρήση απλουστευμένων τεχνικών χειρισμού του υπό έλεγχο φυτικού υλικού

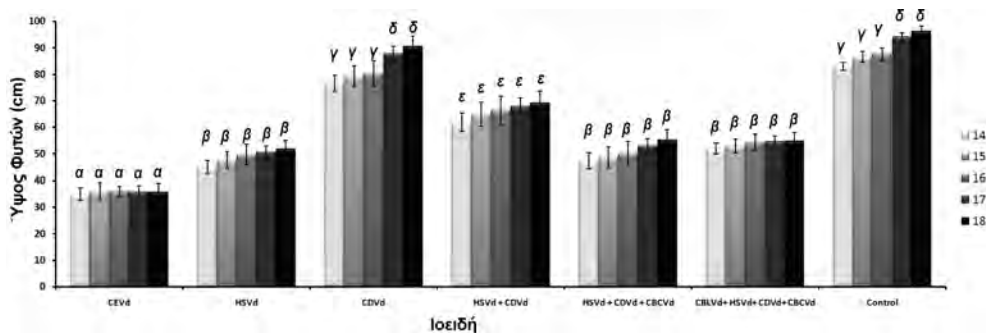
Είναι γνωστό ότι τα ιοειδή των εσπεριδοειδών προκαλούν διάφορα συμπτώματα σε φυτά κитριάς. Σε μια άλλη εργασία μελετήθηκε η εκδήλωση συμπτωμάτων από ιοειδή σε σπορόφυτα κитριάς καθώς και σε κитριάς εμβολιασμένες σε νεραντζιά που ήταν προσβεβλημένη από ένα ή περισσότερους συνδυασμούς ιοειδών. Για το σκοπό αυτό έγιναν τεχνητές μολύνσεις με τα τρία ιοειδή HSVd, CDVd και CEVd. Επιπρόσθετα, έγιναν τεχνητές μολύνσεις και με τρεις συνδυασμούς ιοειδών, HSVd + CDVd, HSVd + CDVd + CBCVd και CBLVd+HSVd + CDVd + CBCVd. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα σοβαρότερα συμπτώματα παρουσιάστηκαν στα σπορόφυτα κитριάς που είχαν μολυνθεί με το ιοειδές CEVd και το συνδυασμό HSVd+ CDVd + CBCVd. Τα συμπτώματα που παρουσιάστηκαν στα φύλλα των δενδρυλλίων κитριάς ήταν σοβαρή επιναστεία, ήπια επιναστεία, νέκρωση του

μίσχου, νέκρωση της κεντρικής νεύρωσης και νέκρωση των νευρώσεων (**Εικόνα 7**). Η σοβαρή επιναστία του φύλλου χαρακτηρίστηκε ως σοβαρό σύμπτωμα, ενώ τα υπόλοιπα ως ήπια συμπτώματα. Το ύψος των κητριών επηρεάστηκε από τα μονήρη ιοειδή και συνδυασμούς ιοειδών. Δεκαοκτώ εβδομάδες μετά τη μόλυνση, το ύψος των κητριών που είχαν μολυνθεί με



Εικόνα 7. Συμπτώματα επιναστίας, καρουλιάσματος και νέκρωσης του μίσχου, και των νευρώσεων φυτών δεικτών μετά από τεχνητή μόλυνση με τα ιοειδή των εσπεριδοειδών

CEVd μειώθηκε κατά 60,3% σε σχέση με τον μάρτυρα που ήταν φυτά κητριάς που δεν είχαν μολυνθεί με ιοειδή. Το ύψος των κητριών που είχαν μολυνθεί με HSVd μειώθηκε κατά 44,3 %. Το ύψος των κητριών που μολύνθηκαν με τους συνδυασμούς HSVd + CDVd, HSVd + CDVd + CBCVd και CBLVd + HSVd + CDVd + CBCVd μειώθηκε κατά 27%, 41% και 41,33 %, αντίστοιχα. Όλες οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο 5%. Το ύψος των κητριών που είχαν μολυνθεί με CDVd μειώθηκε κατά 5,7% σε σχέση με τον μάρτυρα, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Δεκαοκτώ εβδομάδες μετά τη μόλυνση, το ύψος των εμβολιασμένων σε νεραντζιά κητριών που είχαν μολυνθεί με CEVd μειώθηκε κατά 29% σε σχέση με τον μάρτυρα. Το ύψος των εμβολιασμένων σε νεραντζιά κητριών που είχαν μολυνθεί με HSVd, HSVd + CDVd και HSVd + CDVd + CBCVd επηρεάστηκε, αλλά η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική (**Εικόνα 8**) (Καπαρή και συν. 2009).



Εικόνα 8. Επίδραση της παρουσίας απλών ή μικτών μολύνσεων από ιοειδή στο ύψος του φυτοδείκτη της κητριάς μετά την πάροδο 14, 15, 16, 17 και 18 εβδομάδων. Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται με τον ίδιο χαρακτήρα δεν διαφέρουν σημαντικά στο επίπεδο 0.05.

Δ. Προγράμματα εξάλειψης ιοειδών και παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού δενδρωδών καλλιέργειών στην Κύπρο

Τα προγράμματα έχουν ως κύριο στόχο την εξυγίανση, την παραγωγή, τη διατήρηση και τη διάθεση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού αξιόλογων παραδοσιακών και εισαγόμενων ποικιλιών. Το μητρικό φυτικό υλικό αρχικά υποβάλλεται σε ενδεδειγμένους ελέγχους για την παρουσία φυτικών ασθeneιών ή εντομολογικών εχθρών με την εφαρμογή βιοδοκιμών σε φυτά δείκτες καθώς και σύγχρονων εργαστηριακών δοκιμών. Στην περίπτωση που επιβεβαιωθεί η απουσία φυτοπαθολογώνων το υλικό μεταφέρεται και διαφυλάσσεται στις Προβασικές Φυτείες του Ινστιτούτου που αποτελούν τον βασικό πυρήνα. Ακολούθως, μεταφέρεται στις Μητρικές Φυτείες του Τμήματος Γεωργίας και πολλαπλασιάζεται περαιτέρω ώστε να υπάρχει η δυνατότητα διάθεσής του στους παραγωγούς φυτωριούχους. Για την απαλλαγή του υλικού από την παρουσία ιοειδών, ιών ή και άλλων ασθeneιών, χρησιμοποιείται η μεριστωματική καλλιέργεια ή ο μικροεμβολιασμός *in vitro* σε συνδυασμό με διάφορες μεθόδους, όπως η θερμοθεραπεία, η χημειοθεραπεία και η κρυοθεραπεία. Με την καλλιέργεια του ακραίου μεριστώματος επιτυγχάνεται ο αγενής πολλαπλασιασμός του μητρικού δένδρου με ταυτόχρονη αποφυγή των ιών και συναφών παθογόνων από ένα συγκεκριμένο φυτό και παράλληλα παραγωγή νέων φυτών που είναι ίδια με τα μητρικά.

Το ακραίο μερίστωμα είναι, συνήθως, απαλλαγμένο από ιούς και συναφή παθογόνα επειδή η ταχύτητα διαίρεσης των κυττάρων του φυτού είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα πολλαπλασιασμού των ιών, ενώ τα πλασμοδέσματα, που αποτελούν τις διόδους επικοινωνίας μεταξύ των φυτικών κυττάρων, δεν είναι πλήρως ανεπτυγμένα ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως σημεία διακυτταρικής μετακίνησης. Η τεχνική περιλαμβάνει την αφαίρεση του ακραίου μεριστώματος από το προσβεβλημένο μητρικό φυτό και την καλλιέργειά του σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα *in vitro* υπό ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο συνεχούς οριζόντιας ροής αποστειρωμένου αέρα. Όταν το νέο φυτό αναπτυχθεί ικανοποιητικά ακολουθεί η φύτευσή του σε χώμα και η σκληραγώγησή του ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί περαιτέρω σε συνθήκες θερμοκηπίου αρχικά και αργότερα περιβάλλοντος. Η τεχνική του μικροεμβολιασμού ή μεριστωματικού εμβολιασμού *in vitro* συνίσταται στον εμβολιασμό του ακραίου μεριστώματος της υπό εξυγίανση ποικιλίας σε υγιές σπορόφυτο/υποκείμενο που έχει αναπτυχθεί *in vitro*. Η εργασία αυτή γίνεται με τη χρήση ειδικού στερεοοικονομικού. Τα μικροεμβολιασμένα φυτά τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες διαστάσεων 25x150 mm που περιέχουν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Ακολούθως τα μικρόφυτα εκκολάπτονται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (22-25 °C) και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Τα μικροεμβολιασμένα φυτά παρακολουθούνται και σε περίπτωση ανάπτυξης του υποκειμένου πάνω από το σημείο εμβολιασμού ή στα πλάγια, αφαιρούνται οι νέοι αυτοί βλαστοί ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί το μερίστωμα (Karagi-Isaia *et al.*, 2004). Όταν το νέο φυτό αναπτυχθεί ικανοποιητικά ακολουθεί η φύτευσή του σε χώμα ή ο μετεμβολιασμός του σε άλλο αναπτυγμένο υγιές σπορόφυτο και η σκληραγώγησή του ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί περαιτέρω σε συνθήκες θερμοκηπίου αρχικά και αργότερα περιβάλλοντος (Karagi-Isaia *et al.*, 2002; Karagi-Isaia, 2006).

Το υλικό που παράγεται με τους δύο αυτούς τρόπους εισάγεται στις Προβασικές Φυτείες του Ινστιτούτου που στεγάζονται σε εντομοστεγή δικτυοκήπια στην Αχέλεια, στον Σαϊττά

και στο Ζύγι (Kapari-Isaia *et al.*, 2007). Εκεί τα δενδρύλλια φυτεύονται σε γλάστρες των 70 λίτρων. Συνήθως διατηρούνται 3 δενδρύλλια για κάθε είδος/ποικιλία. Τα δενδρύλλια αυτά υπόκεινται σε ιολογικούς ελέγχους σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EPPO 2005) και τους Νόμους «Περί παραγωγής και εμπορίας πολλαπλασιαστικού υλικού του 1991 μέχρι 2002» της Κυπριακής Δημοκρατίας. Λαμβάνονται παράλληλα μέτρα προστασίας σε συνεχή βάση, όπως αποστείρωση των εργαλείων κλαδέματος, είσοδος στα δικτυοκήπια μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό και αποστείρωση των υποδημάτων όσων εισέρχονται εντός της Φυτείας. Πολλαπλασιαστικό υλικό από τα δένδρα αυτά, που αποτελούν τον αρχικό πυρήνα, δίνεται στο Τμήμα Γεωργίας, το οποίο έχει την ευθύνη για τη διατήρησή του σε μητρικές φυτείες και για παραγωγή εμβολίων για διάθεση σε φυτωριούχους και παραγωγούς (Kapari-Isaia *et al.*, 2009; Kapari-Isaia *et al.*, 2011).

Δ1. Πρόγραμμα Εξυγίανσης αξιόλογων κλώνων και ποικιλιών εσπεριδοειδών της Κύπρου

Η εφαρμογή του Σχεδίου 'ΕΣΠΕΡΙΔΕΣ' με τίτλο 'Εξυγίανση και Μοριακή Ταυτοποίηση Κυπριακών Κλώνων και Ποικιλιών Εσπεριδοειδών' άρχισε το 2002 με επισκόπηση στις περιοχές καλλιέργειας εσπεριδοειδών της Κύπρου. Κατά την επισκόπηση αυτή, επιλέγησαν 30 αξιόλογες απομονώσεις της Γιαφίτικης Πορτοκαλιάς, πέντε απομονώσεις Φράππας και πέντε απομονώσεις Περγαμόντ. Οι απομονώσεις αυτές αποτελούν το μητρικό υλικό εσπεριδοειδών. Επιπρόσθετα επιλέγησαν απομονώσεις της Μανταρινιάς Αρακαπά, της Πολύφορης Λεμονιάς, της Λεμονιάς Λαπήθου, Κουμανταντά, και των πορτοκαλιών Σιεκέρικη, Βαλέντσια και Αιματούσικη. Πολλαπλασιαστικό υλικό από τα δένδρα αυτά, μεταφέρθηκε σε δικτυοκήπιο στο Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών, όπου φυλάσσονται όλα τα μητρικά δένδρα από κυπριακούς κλώνους και ποικιλίες εσπεριδοειδών που παρουσιάζουν αξιόλογα χαρακτηριστικά. Ο πολλαπλασιασμός έγινε με εμβολιασμό υλικού του κάθε μητρικού δένδρου σε τρία ποικιλιακά κίτρομηλιά. Παράλληλα έγινε ο ιολογικός έλεγχος των μητρικών δένδρων ώστε να διαπιστωθεί τυχόν προσβολή τους από ιολογικές και συναφείς ασθένειες. Τα μητρικά δένδρα ελέγχθηκαν για όλα τα γνωστά ιολογικά προβλήματα. Διενεργήθηκε έλεγχος με την ορροδιαγνωστική μέθοδο ELISA για τον ιό της τριστέζας των εσπεριδοειδών (*Citrus tristeza virus*, CTV). Ακολούθησε έλεγχος με τη χρήση της βιολογικής μεθόδου (φυτά- δείκτες). Όλα τα δένδρα ήταν προσβεβλημένα με ιοειδή, πέντε δένδρα ήταν προσβεβλημένα με τον ιό της ψώρωσης των εσπεριδοειδών (*Citrus psorosis virus*, CPsV), ενώ όλα τα δένδρα ήταν απαλλαγμένα από τον ιό της τριστέζας. Επίσης εφαρμόστηκε η εργαστηριακή μέθοδος της ηλεκτροφόρησης (ανάλυση του ssRNA σε πήκτωμα 5% πολυακρυλαμίδιου – PAGE) ώστε να γίνει διαχωρισμός των ιοειδών που υπήρχαν σε κάθε μητρικό δένδρο. Από τους ελέγχους που έγιναν φάνηκε ότι τα μητρικά δένδρα ήταν προσβεβλημένα με τα ιοειδή CEVd, CBLVd, HSVd και CDVd. Ακολούθως, εφαρμόστηκε η μέθοδος του μεριστωματικού εμβολιασμού για εξυγίανση των μητρικών δένδρων. Έγιναν 383 μικροεμβολιασμοί με εμβόλια που προέρχονταν σχεδόν από όλα τα επιλεγμένα μητρικά δένδρα. Χρησιμοποιήθηκαν τα υποκείμενα Carrizo Citrange, Citrumelo, Troyer Citrange, Κίτρομηλιά και Βαλέντσια. Τα μεριστώματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από τα μητρικά δένδρα στο χωράφι, από τα μητρικά δενδρύλλια στο δικτυοκήπιο και από βλαστούς που αναπτύχθηκαν στους σωλήνες. Από τα φυτά που μικροεμβολιάστηκαν αναπτύχθηκαν

ικανοποιητικά τα 140 (ποσοστό επιτυχίας 36%). Ορισμένα από τα φυτά αυτά μετεμβολιάστηκαν σε αναπτυγμένα υγιή σπορόφυτα κιτρομηλιάς, ενώ τα υπόλοιπα φυτεύτηκαν κατευθείαν σε γλάστρες και τοποθετήθηκαν σε δωμάτια με σταθερή θερμοκρασία 22-27 °C και φωτισμό 16 ωρών. Μερικά από τα νεαρά φυτά που προήλθαν από μικροεμβολιασμό και αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά ελέγχθηκαν με εργαστηριακές και βιολογικές μεθόδους για να διαπιστωθεί αν απαλλάγηκαν από τις ασθένειες που έφεραν τα μητρικά δένδρα. Τα εξυγιανθέντα δένδρα που προέρχονταν από όλες τις ποικιλίες τοποθετήθηκαν στην Προβασική Φυτεία Εσπεριδοειδών του Ινστιτούτου, όπου διατηρούνται όλα τα είδη, ποικιλίες και κλώνοι εσπεριδοειδών που υπάρχουν σε υγιή μορφή στην Κύπρο.

Δ2. Πρόγραμμα Εξυγίανσης ελληνικών elite ποικιλιών εσπεριδοειδών

Στο πλαίσιο των κοινών ερευνητικών και τεχνολογικών προγραμμάτων Κύπρου και Ελλάδας 2006–2008, αναπτύχθηκε με συνεργασία του Κλάδου Φυτοπροστασίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και του Δενδροκομικού Σταθμού Πόρου ένα πρόγραμμα εξυγίανσης ποικιλιών εσπεριδοειδών elite που καλλιεργούνται στην Ελλάδα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του μικροεμβολιασμού *in vitro*. Το πρωτογενές υλικό προέρχονταν από το Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου και τα φυτώρια Ιωάννη Σταματάκου, από δένδρα των παρακάτω εσπεριδοειδών: Γκρέϊπφρουτ (Shambar, Star Ruby), Λεμονιά (Αδαμοπούλου, Βακάλου, Ζαμπετάκη, Interdonato, Nouvel Athos, Verna), Μανταρινιά (Κλημεντίνη Πόρου, Χιώτικο, Clasuelina, Encore, Marisol, Page, Tardivo di Ciaculli, Κλημεντίνη SRA-63, Nova), Πορτοκαλιά (Valencia Πόρου, όψιμο ομφαλοφόρο Άργους, Moro, Navelate, Lane Late, Salustiana, Valencia Olinda, Navelina, Newhall, Washington navel). Εμβόλια από τις επιλεγμένες ελληνικές ποικιλίες μεταφέρθηκαν και εμβολιαστήκαν σε υγιή σπορόφυτα νεραντζιάς σε θερμοκήπιο του ΙΓΕ. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική τού μεριστωματικού εμβολιασμού (ή μικροεμβολιασμού του ακραίου μεριστώματος) σε σωλήνα (shoot-tip grafting *in vitro*), για την εξυγίανση των επιλεγμένων ελληνικών ποικιλιών εσπεριδοειδών κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Για τον μικροεμβολιασμό χρησιμοποιήθηκαν κορυφαία μεριστώματα που προέρχονταν είτε από δενδρύλλια που παρήχθησαν με εμβολιασμό των εσπεριδοειδών σε υγιή σπορόφυτα νεραντζιάς στο θερμοκήπιο του ΙΓΕ, είτε απευθείας από το πρωτογενές υλικό. Τα υποκείμενα που χρησιμοποιήθηκαν στον μικροεμβολιασμό ήταν τρίπτερα (Carrizo Citrange, Troyer Citranze, CRC 1452 Citrumelo). Παρήχθησαν καθαρά δενδρύλλια Μανταρινιάς Page, Γκρέϊπφρουτ Star Ruby, Πορτοκαλιάς Moro, Πορτοκαλιάς Lane Late, Μανταρινιάς Nova, Πορτοκαλιάς Βαλέντσια, (Karari-Isaia *et al.*, 2011).

Ε. Διερεύνηση της παρουσίας ιοειδών σε διάφορες καλλιέργειες της Κύπρου

Η ραγδαία διάδοση επιβλαβών ιοειδών σε πολλές γεωγραφικές περιοχές του πλανήτη τα τελευταία 15 χρόνια, πιστεύεται ότι οφείλεται στην παγκοσμιοποίηση του διεθνούς εμπορίου και στην ευκολία με την οποία διακινείται το φυτικό πολλαπλασιαστικό υλικό μεταξύ των κρατών. Ο Κλάδος Φυτοπροστασίας με τη συμμετοχή του σε ερευνητικές δραστηριότητες και ομάδες εργασίας που δημιουργήθηκαν μέσα από το ευρωπαϊκό δίκτυο EUPHRESO Era Net, διεξήγαγε σε συνεργασία με Λειτουργούς του Κλάδου Φυτοϋγειονομικού Ελέγχου και

Ελέγχου Ποιότητας του Τμήματος Γεωργίας εκτεταμένες επισκοπήσεις για τη διερεύνηση της παρουσίας ιοειδών που εντάσσονται στα παθογόνα καραντίνας για την ΕΕ. Στους ελέγχους περιελήφθησαν τα ιοειδή PSTVd, TASVd, TCDVd και CSVd, που ανήκουν στο γένος *Pospoviridae* (**Πίνακας 1**). Για τον σκοπό αυτό, κατά τη χρονική περίοδο 2010-2012 έγινε συλλογή φυτικού υλικού από 400 καλλωπιστικά είδη (χρυσάνθεμα, γιασεμί, κ.ά.), καθώς και από καλλιέργειες λαχανοκομικών ειδών όπως, σολανώδη (πατάτες, ντομάτες, μελιτζάνες), κολοκυνθοειδή (αγγούρια, κολοκύθια, πεπονοειδή). Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε εργαστηριακούς ελέγχους με τη χρήση σύγχρονων μοριακών δοκιμών, όπως ορίζονται από τα πρωτόκολλα που δημοσιεύει ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Προστασίας Φυτών της ΕΡΡΟ (European Plant Protection Organization). Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την απουσία αυτών των οργανισμών από την Κύπρο (Παπαγιάννης και Καπαρή-Ησαΐα, 2014).

Εξάλλου, στο πλαίσιο μελέτης που έγινε για τη διάδοση των CEVd και HSVd σε καλλιέργειες πέραν των εσπεριδοειδών, διαπιστώθηκε ότι τα δύο ιοειδή ανιχνεύτηκαν σε αμπέλια και συκίες, χωρίς απαραίτητα να εμφανίζουν συμπτώματα. Επιπλέον, το HSVd ταυτοποιήθηκε σε ροδακινιές, δαμασκηνιές, βερυκοκιές και ροδιές που δεν παρουσίαζαν μορφολογικές αλλοιώσεις (Parayiannis, 2014).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Καπαρή-Ησαΐα, Θ., Κυριακού, Α., και Παπαγιάννης, Λ.Χ. 2009. Αλληλεπίδραση ιοειδών εσπεριδοειδών. *Πρακτικά 23^{ου} Πανελληνίου Επιστημονικού Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Οπωροκηπευτικών*, 1-4 Νοεμβρίου, 2011, Χανιά. σελ. 337-340.

Παπαγιάννης, Λ.Χ., και Καπαρή-Ησαΐα, Θ. 2014. Ιοειδή της εξοκόρτιδας των εσπεριδοειδών και του νανισμού του λυκίσκου στην Κύπρο. Διάγνωση, Χαρακτηρισμός, Ξενιστές. *Πρακτικά Περιλήψεων 17^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο*, Βόλος 5-8 Οκτωβρίου 2014, σελ. 113.

Diener, T.O. 1971. Potato spindle tuber “virus”. A replicating low molecular weight RNA. *Virology* **45**, 411-428.

Diener, T.O., and Raymer, W.B. 1967. Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science* **158**378-381.

Diener, T.O. 2001. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? *Advances in Virus Research* **57**, 137-184.

Duran-Vila, N., and Semancik, J.S. 2003. Citrus Viroids. In *Viroids*. (eds Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., and Semancik, J.S.) CSIRO Publishing, Melbourne, Australia. pp 178-194.

Flores, R., Randles, J.W., Owens, R.A., Bar-Joseph, M., and Diener, T.O. 2004. *Viroidae* In *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature, VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (eds. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, A.L.) Elsevier/Academic Press, London, UK. pp 1147-1161.

Flores, R., Hernandez, C., Martinez de Alba, E., Daros, J.A., and Di Serio, F. 2005. Viroids and Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 117-139.

Hammond, R.W., and Owens, R.A. 2006. Viroids: New and Continuing Risks for Horticultural and Agricultural Crops. American Phytopathological Society Feature Story, November 2006 (<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx>.)

Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K., and Ito, T. 2000. Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **106**, 235-239.

Kapari-Isaia, T., Minas, G.J., Polykarpou, D., Iosephidou, E., Arseni, S., and Kyriakou, A. 2002. Shoot-tip grafting *in vitro* for elimination of viroids and citrus psorosis virus in the local ‘Arakapas’ mandarin in Cyprus. *Proceedings, 15th International Organisation of Citrus Virologists Conference*. 13-18 September, 1998. Riverside, California pp 417-419.

Kapari-Isaia, T., Minas, G., and Kyriakou, A. 2004. Production of healthy Arakapas mandarin plants by shoot-tip grafting *in vitro*. Technical Bulletin 222, Agricultural Research Institute, Lefkocia, Cyprus (ISSN 0070-2315), 7 pp.

Kapari-Isaia, T. 2006. Sanitation of citrus varieties and clones in Cyprus. Agricultural Research Institute, Conos Press, Cyprus, ISBN 9963-1-6005-0 (in Greek), 203 pp.

Kapari-Isaia, T., Kyriakou, A., Ioannides, I., Papayiannis, L., and Minas G. 2007. Sanitation of local citrus clones and /or varieties in Cyprus. *Acta Horticulturae* **741**, 301-306.

- Kapari-Isaia, T., Kyriakou, A., Papayiannis, L.C., Tsaltas, D., Gregoriou, S., and Psaltis, I. 2008. Rapid *in vitro* microindexing of viroids in citrus. *Plant Pathology* **57**, 348-353.
- Kapari-Isaia, T., Kyriakou, A., Samouel, S., Papayiannis, L. C., and Gavriel, I. 2009. Sanitation of stone fruits in Cyprus. *Phytopathologia Mediterranea* **48**, 323.
- Kapari-Isaia, T., Voloudakis, A.E., Kyriakou, A., Ioannides, I., Papayiannis, L., Samouel, S., Koutsoumari, E. M., Georgiou, A., and Minas, G. 2011. Sanitation of citrus varieties and/or clones by *in vitro* micrografting in Cyprus and Greece. *Acta Horticulturae* **892**, 279-285.
- Kyriakou, A.P. 1992. Incidence in Cyprus of Citrus exocortis viroid and its mechanical transmission. *Plant Pathology* **41**, 20-24.
- Kyriakou, A., Ioannou, M., Hadjinicolis, A., Hoffman, R., Antoniou, E., Papayiannis, L. C., Kapari, T., and Ioannou, N. 2004. Citrus Exocortis and Cachexia Viroids affect growth, yield and fruit quality of Lapithou lemon on sour orange rootstock in Cyprus. *Proceedings, 16th International Organisation of Citrus Virologists Conference*. 7-13 November, 1998. Monterrey, Mexico. pp 257-263.
- Mullis, K. and Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Methods of Enzymatology* **155**, 335-350.
- Papayiannis, L.C. 2014. Diagnostic real-time RT-PCR for the simultaneous detection of *Citrus exocortis viroid* and *Hop stunt viroid*. *Journal of Virological Methods* **196**, 93-99.
- Radles, J.W., and Rodriguez, M.J.B. 2003. Coconut cadang-cadang viroid. In *Viroids* (eds Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., and Semancik, J.S.) CSIRO Publishing, Melbourne, Australia. pp 233-241.
- Roistacher, C. N. 1991. Techniques for biological detection of specific citrus graft-transmissible diseases, FAO, Rome (ISBN 92-5-103182-7), 206 pp.
- Sanjeev, S., Balwinder, S., Gita, R., Aijar asghar, Z., Vipin, H., Avinash, N., and Singh, V. 2007. Production of Indian Citrus ringspot virus free plants employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. *Journal Central European Agriculture* **8**, 1-8.
- Semancik, J.S., Rakowski, A.G., Bash, J.A., and Gumpf, D.J. 1997. Application of selected viroids for dwarfing and enhancement of production of Valencia orange. *Journal of Horticultural Science* **72**, 563-570.
- Semancik, J.S., and Weathers, L.G. 1972. Exocortis disease: Evidence for a new species of infectious low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biology* **237**, 242-244.
- Singh, R.P., Ready, K., F.M., and Nie, X. 2003. Part II. Biology. In *Viroids* (eds Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., and Semancik, J.S.) CSIRO Publishing: Australia pp 30-48.
- Wang, Q., Cuellar, W., Rajamaki, M.L., Hirata, Y., and Valkonen, J.T. 2008. Combined chemotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology* **9**, 237-250.
- Wang, Q., Panis, B., Engelmann, F., Lambardi, M., and Valkonen, J.P.T, 2009. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen elimination to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology* **154**, 351-363.



Γ.Τ.Π. 235/2015 – 200 ISSN 1986-1370
Εκδόθηκε από το Γραφείο Τύπου και Πληροφοριών
Εκτύπωση: Τυπογραφείο Κυπριακής Δημοκρατίας



Τυπώθηκε σε ανακυκλωμένο χαρτί