



Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Παραδοτέο Π.4.9.1: Δεδομένα βιοδοκιμών για προσέλκυση του παρασιτοειδούς παρουσία των CMV και PVY σε φυτά τομάτας

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.9.1**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ4**

Επικεφαλής δικαιούχος: **ΜΦΙ**

Συγγραφείς: **Ειρήνη Αναστασάκη, Δέσποινα Μπερή, Ιωάννα Μαλανδράκη, Νίκων Βασιλάκος, Χριστίνα Βαρβέρη, Πολυξένη Νικολάου, Γεώργιος Παρτσινέβελος, Παναγιώτης Μυλωνάς**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**

Ημερομηνία παράδοσης: **31/12/2025**

Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (EN): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: ΤΑΕΔΡ-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	4
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	5
2.1	Υλικά και Μέθοδοι	5
2.1.1	Ιοί- Φυτά- Τεχνητές μολύνσεις- Έντομα	5
2.1.2	Παραλαβή πτητικών	7
2.1.3	Αέρια Χρωματογραφία	8
2.1.4	Βιοδοκιμές συμπεριφοράς	9
2.1.5	Στατιστική ανάλυση	9
2.2	Αποτελέσματα	10
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	14
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	15
	Βιβλιογραφία	15

Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Σύνοψη της ΕΕ4

Στην ΕΕ4 θα αναπτυχθούν δράσεις που θα ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα της βιολογικής καταπολέμησης. Θα γίνει βελτίωση της αρμοστικότητας των ωφέλιμων αρπακτικών και ενίσχυση της δράσης τους, καθώς επίσης και αξιοποίηση της λειτουργικής βιοποικιλότητας για την ανάπτυξη καλύτερα προσαρμοσμένης βιολογικής καταπολέμησης. Θα αναπτυχθούν βελτιωμένα προϊόντα για τη βιολογική καταπολέμηση, θα διερευνηθεί η αξιοποίηση άγριων αυτοφυών φυτών για την ενίσχυση των οικοσυστημικών υπηρεσιών για την αντιμετώπιση επιβλαβών οργανισμών μέσω της βιολογικής καταπολέμησης και θα ενισχυθεί η δράση παρασιτοειδών με χρήση ουσιών φυσικής προέλευσης ή/και «ωφέλιμων ιών». Θα αναπτυχθούν βελτιωμένες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των εχθρών μέσω της χρήσης βακτηρίων και μικροοργανισμών. Θα αναπτυχθούν τέλος καινοτόμες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των ζιζανίων, μέσω προσεγγίσεων αξιοποίησης της βιοποικιλότητας και καλλιεργητικών πρακτικών.

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου (executive summary)

Στο παρόν παραδοτέο αποτυπώνονται τα δεδομένα βιοδοκιμών της επίδραση των ιών του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) και Υ της πατάτας (potato virus Y, PVY) στη συμπεριφορά του παρασιτοειδούς *Aphidius colemani* σε φυτά τομάτας απουσία λείας του παρασιτοειδούς (αφίδες) καθώς και σε φυτά πιπεριάς παρουσία αφίδων.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Πληθώρα ειδών αφίδων όπως *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* (Sternorrhyncha: Aphididae) είναι φορείς πολλών σημαντικών ιών, δυο εξ αυτών είναι ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (Cucumber mosaic virus, CMV) και ο ιός Υ της πατάτας (Potato virus Y, PVY). Οι παθογόνοι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των ιών, έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλουν το προφίλ των πτητικών ενώσεων των φυτών-ξενιστών τους. Είναι γνωστό ότι φυτικές πτητικές ενώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως σήματα επικοινωνίας επηρεάζοντας αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυτών, μικροοργανισμών και εντόμων (Bruce & Pickett, 2011). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ των παρασιτοειδών, των ξενιστών τους και των φυτικών ειδών γίνεται πιο πολύπλοκη όταν εμπλέκονται και παθογόνοι οργανισμοί (Tack and Dicke, 2013).

Υπάρχουν ολοένα και περισσότερες ενδείξεις ότι οι παθογόνοι οργανισμοί διαδραματίζουν ρόλο στη διαμόρφωση και την τροποποίηση της συμπεριφοράς των φυσικών εχθρών. Έχει αναφερθεί ότι οι φυσικοί εχθροί των αφίδων όπως το είδος *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphelinidae) εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά παρασιτισμού σε αφίδες που τρέφονται σε προσβεβλημένα φυτά σε σχέση με αφίδες που τρέφονταν σε μη προσβεβλημένα φυτά (Mauck et al. 2015).

Πρόσφατα μελετήσαμε την προσέλκυση του παρασιτοειδούς εντόμου *A. colemani* σε προσβεβλημένα φυτά πιπεριάς από τους ιούς CMV ή PVY χωρίς την παρουσία αφίδων (Milonas et al., 2023). Τα παρασιτοειδή παρουσίασαν προτίμηση προς τα φυτά μολυσμένα με CMV και PVY σε σύγκριση με εκείνα που δεν ήταν μολυσμένα.

Ο σκοπός του παραδοτέου είναι να διευρύνουμε τις γνώσεις σε φυτά τομάτας τόσο με παρουσία όσο και χωρίς την παρουσία αφίδων. Με αυτό τον τρόπο θα μελετηθούν σε λεπτομέρεια οι αλληλεπιδράσεις ιών, φυτών, αφίδων και παρασιτοειδών για την καλύτερη κατανόηση αυτών και της επιδημιολογίας των ιών καθώς και το βέλτιστο σχεδιασμό ολοκληρωμένης αντιμετώπισης ιών και αφίδων φορέων τους.

Αρχικά έγιναν πειράματα σε φυτά τομάτας ιωμένα με τους ιούς CMV PVY χωρίς την παρουσία αφίδων. Ωστόσο, κατά την προσβολή των φυτών τομάτας με αφίδες υπήρχε αδυναμία εγκατάστασης του πληθυσμού των αφίδων, οπότε για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν φυτά πιπεριάς.

Το παρόν έγγραφο ακολουθεί την παρακάτω δομή:

1. Εισαγωγή και Στόχοι: Παρουσιάζεται το πλαίσιο της έρευνας και οι στόχοι του εγγράφου.
2. Περιγραφή των Εργασιών: 2.1 Υλικά και Μέθοδο, 2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση.
3. Σύνοψη και Συμπεράσματα: Βασικά ευρήματα της έρευνας και σχετικά συμπεράσματα.
4. Παράρτημα: Βιβλιογραφικές αναφορές.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1 Ιοί- Φυτά- Τεχνητές μολύνσεις- Έντομα

Αρχικά έγινε παραγωγή μολυσμάτων των απομονώσεων I17F του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) και SON41 του ιού Y της πατάτας (potato virus Y, PVY), της συλλογής του Εργαστηρίου Ιολογίας, σε φυτά των ειδών *Nicotiana glutinosa* και *N. benthamiana*, αντίστοιχα, μετά από μηχανική τους μετάδοση.

Πραγματοποιήθηκε συνεχής ανάπτυξη φυτών τομάτας (ποικιλία ACE 55VF) και πιπεριάς (ποικιλία Yellow Wonder) στο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ιολογίας του ΜΦΙ (Εικόνα 4.9.1-1) υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού (20-26°C, φωτοπερίοδος 16 h φως /8 h σκοτάδι).

Στο στάδιο των δύο πλήρως εκπτυγμένων φύλλων, το ανώτερο πλήρως εκπτυγμένο φύλλο μολύνθηκε μηχανικά με τον CMV ή τον PVY. Η μηχανική μόλυνση πραγματοποιήθηκε με τριβή ομογενοποιημένου μολυσμένου ιστού σε αναλογία 1:3 με διάλυμα KPO₄ 0.03M pH 7.4 και 20mg/mL carborundum. Φυτά στα οποία πραγματοποιήθηκε η διαδικασία μηχανικής μόλυνσης απουσία ιού αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες (Mock) (Εικόνα 4.9.-2).

Για τις βιοδοκιμές συμπεριφοράς με ολφακτόμετρο τύπου Y και για τη συλλογή των πτητικών στα φυτά τομάτας χωρίς την παρουσία αφίδων χρησιμοποιήθηκαν φυτά 15-19 ημέρες μετά τη μόλυνση. Αντίστοιχης ηλικίας ήταν και τα φυτά μάρτυρες.

Για κάθε μεταχείριση προετοιμαζόταν 12 φυτά. Συνολικά η προετοιμασία φυτών για κάθε μεταχείριση επαναλήφθηκε οκτώ φορές για τον CMV (συνολικός αριθμός φυτών ανά μεταχείριση 96) και 5 για τον PVY (συνολικός αριθμός φυτών ανά μεταχείριση 60).



Εικόνα 4.9.1-1: Φυτά τομάτας (A) και πιπεριάς (B) στο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ιολογίας



Εικόνα 4.9.1-2: Φυτό τομάτας προσβεβλημένο με τον ιό CMV (A) και σύγκριση φυτών τομάτας ιωμένο με CMV και μάρτυρα (Mock) (B)

Στην περίπτωση των φυτών πιπεριάς η τεχνική μόλυνση πραγματοποιήθηκε όπως παραπάνω μόνο για τον ιό CMV, λόγω της ισχυρότερης επίδρασης του CMV στην προσέλκυση του παρασιτοειδούς *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphelinidae) σε σχέση με τον PVY.

Οι αφίδες ήταν του είδους *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) διατηρούταν σε φυτά πιπεριάς (ποικιλία Yellow Wonder) εντός εντομολογικών κλωβών 60X60X60 cm (Bugdorm, Taiwan) σε ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, σχετική υγρασία $65\pm 5\%$, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως/8 ώρες σκότος), στο εντομοτροφείο του Εργαστηρίου Βιολογικής Καταπολέμησης.

Δέκα με δώδεκα ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών πιπεριάς με τον ιό CMV, πέντε ενήλικα θηλυκά άτομα *Myzus persicae* τοποθετήθηκαν με τη χρήση λεπτού πινέλου στα νεοαναπτυσσόμενα φύλλα κάθε φυτού. Τα ιωμένα και προσβεβλημένα φυτά διατηρούταν εντός εντομολογικών κλωβών 60X60X60 cm (Bugdorm, Taiwan) σε ελεγχόμενες συνθήκες στο θερμοκήπιο για 5-7 ημέρες μέχρι τη χρήση τους. Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε και στα φυτά-μάρτυρες. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν φυτά πιπεριάς 15-19 ημέρες μετά τη μόλυνση. Αντίστοιχης ανάπτυξης ήταν και τα φυτά μάρτυρες.

Για κάθε μεταχείριση προετοιμαζόταν 12 φυτά. Συνολικά η προετοιμασία φυτών για κάθε μεταχείριση επαναλήφθηκε πέντε φορές για τον CMV (συνολικός αριθμός φυτών ανά μεταχείριση 60)

Τα παρασιτοειδή έντομα *Aphidius colemani* προμηθευόντουσαν εβδομαδιαίως από την εταιρία Koppert Hellas και η διατήρησή τους γινόταν εντός εντομολογικών κλωβών 60X60X60 cm (Bugdorm, Taiwan) με την παροχή νερού και μελιού, σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), σχετικής υγρασίας ($65\pm 5\%$) και φωτοπερίοδου (16 ώρες φως/8 ώρες σκότος), στο εντομοτροφείο του εργαστηρίου Βιολογικής Καταπολέμησης.

Μετά την ολοκλήρωση των βιοδοκιμών με το ολφακτόμετρο, όλα τα φυτά ελέγχθηκαν με ανοσοδοκιμή ELISA με εμπορικά κιτ της εταιρείας LOEWE®Biochemica GmbH Γερμανίας για να επαληθευθεί η παρουσία του ιού.

2.1.2 Παραλαβή πτητικών

Για την παραλαβή των πτητικών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κατανομής στην υπερκείμενη αέρια φάση σύμφωνα με τους Anastasaki et al., (2018). Τα φυτά τοποθετούνταν σε κατάλληλους θαλάμους συλλογής πτητικών (Εικόνα 4.9.1-3), όπου το χώμα καλυπτόταν με αλουμινόχαρτο. Ο αέρας εισχωρούσε στο θάλαμο αφού προηγουμένως διερχόταν από φίλτρο ενεργού άνθρακα (10 cm μήκος x 1.5 cm εσωτερική διάμετρος, με 0.5 g ενεργού άνθρακα) [Merck, Darmstadt, Germany] για να διασφαλιστεί η καθαρότητά του. Στην έξοδο τοποθετήθηκε παγίδα πτητικών ουσιών που αποτελούσαν από ένα σωλήνα Teflon (5 cm μήκος x 4mm εσωτερική διάμετρο), εντός του οποίου είχε τοποθετηθεί 75 mg προσροφητικού υλικού Porapak Q, ανάμεσα σε υαλοβάμβακα 2 mm και τάπες από μικρότερης διαμέτρου (3 mm) σωλήνα Teflon. Η παγίδα ήταν συνδεδεμένη με αντλία κενού (Charles Austen Pumps Ltd., Byfleet, UK) και η ροή συλλογής ρυθμιζόταν με ροόμετρο (Kylola, Muurame, Finland) στα 500 mL min⁻¹. Πριν τη χρήση τους, οι παγίδες εκλούστηκαν διαδοχικά με 1 mL μεθανόλης, διαιθυλαιθέρα και n-πεντανίου. Η διάρκεια συλλογής ήταν 6 ώρες (μεταξύ 9:00 και 15:00). Μετά τη συλλογή, πραγματοποιήθηκε έκλουση των παγίδων με 500 μL n-πεντανίου. Το παραλαμβανόμενο δείγμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο αέριας χρωματογραφίας των 2 mL, τα οποία διατηρήθηκαν στους -20 °C έως τη χημική ανάλυση. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν συλλογές σε κενούς θαλάμους, καθώς και από καθαρές παγίδες και εκλούστηκαν με 500 μL n-πεντανίου όπως παραπάνω με στόχο τον προσδιορισμό των πτητικών του περιβάλλοντος χώρου. Τα πτητικά αυτά αφαιρέθηκαν από τις συλλογές των δειγμάτων.



Εικόνα 4.9.1-3: Διάταξη συλλογής πτητικών από φυτά τομάτας (A) και φυτά πιπεριάς (B) με την τεχνική της κατανομής στην υπερκείμενη αέρια φάση.

2.1.3 Αέρια Χρωματογραφία

Τα δείγματα αναλύθηκαν με αέριο χρωματογράφο Shimadzu Nexis GC-2030 (Εικόνα 4.9.1-4) εφοδιασμένο με ανιχνευτή φασματομέτρο μάζας QP2020 NX απλού τετράπολου (Shimadzu, Kyoto, Japan) που είχε εξοπλιστεί με MEGA-5 MS τριχοειδή στήλη (5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane) μήκους 30 m, διαμέτρου 0,25 mm και πάχους 0,25 μm . Ένα μL από κάθε δείγμα εισήχθη στο θάλαμο εξαέρωσης με τη βοήθεια αυτόματου δειγματολήπτη σε θερμοκρασία 250 $^{\circ}\text{C}$. Το ήλιο (He) χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με σταθερή ροή 1 mL min^{-1} . Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης ξεκινούσε από τους 50 $^{\circ}\text{C}$ όπου παρέμενε για 5 min και σταδιακά με ρυθμό 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ έφτανε τους 170 $^{\circ}\text{C}$. Στη συνέχεια, με ρυθμό 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ έφτανε την τελική θερμοκρασία των 250 $^{\circ}\text{C}$. Ο φασματογράφος μάζας λειτουργούσε με πηγή ιονισμού (Electron ionization mode) με ενέργεια ιονισμού -70 eV, νήμα ρεύματος 50 μA και θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς του ανιχνευτή στους 200 $^{\circ}\text{C}$. Η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες πλήρους σάρωσης (full scan mode) και καταγράφηκε η περιοχή από 40 έως 300 amu (λόγος μάζας προς φορτίο, m/z).



Εικόνα 4.9.1-4: Αέριος χρωματογράφος Shimadzu Nexis GC-2030 εφοδιασμένο με ανιχνευτή φασματομέτρο μάζας QP2020 NX απλού τετράπολου.

Για την ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών έγινε χρωματογραφική ανάλυση μίγματος n-αλκανίων αναφοράς ($\text{C}_8\text{-C}_{20}$) και υπολογίστηκε ο δείκτης κατακράτησης (Retention Index - RI) της κάθε ουσίας, ο οποίος συγκρίθηκε με βιβλιογραφικά δεδομένα. Παράλληλα, έγινε σύγκριση της σειράς έκλουσης, του δείκτη κατακράτησης (RI) και των φασμάτων μάζας με αυτά προτύπων ουσιών που είχαμε στη διάθεσή μας, με δεδομένα βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας (NIST 2017, Wiley7) καθώς και με βιβλιογραφικές αναφορές (Adams, 2007; NIST - WebBook site). Τα χρωματογραφήματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό LAB solutions (έκδοση 4) βασισμένο στο χρόνο κατακράτησης και το φάσμα μάζας.

2.1.4 Βιοδοκιμές συμπεριφοράς

Οι βιοδοκιμές διεξήχθησαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Milonas et al, 2019. Η διάταξη φαίνεται στην εικόνα 4.9.1-5. Το ολφακτόμετρο τύπου Y που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατασκευασμένο από γυαλί και το μήκος του κεντρικού άξονα είναι 8 cm και των βραχιόνων 10 cm. Κάθε βραχίονας κατέληγε στους θαλάμους όπου τοποθετείται το κάθε οσφρητικό ερέθισμα. Ατμοσφαιρικός αέρας φιλτράρεται μέσα από φίλτρα ενεργού άνθρακα, υγροποιείται και διοχετεύεται προς τους δύο θαλάμους που περιέχουν τα ερεθίσματα με ροή που ελέγχεται από ροόμετρο. Ο χρόνος αναμενόμενης ανταπόκρισης του εντόμου ήταν 5 λεπτά. Θηλυκά ενήλικα άτομα ηλικίας 1-2 ημερών χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 8 φυτά και για κάθε φυτό 10 παρασιτοειδή.



Εικόνα 4.9.1-5: Διάταξη ολφακτομέτρου τύπου Y που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διερεύνηση της ανταπόκρισης των παρασιτοειδών *A. colemani*.

2.1.5 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα των εκπομπών των πτητικών συστατικών μετασχηματίστηκαν σε λογαριθμική κλίμακα και επεξεργάστηκαν με το μοντέλο PLS-DA (partial least square discriminant analysis) με το λογισμικό SIMCA 18 (Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umeå, Sweden) για την ταξινόμησή τους.

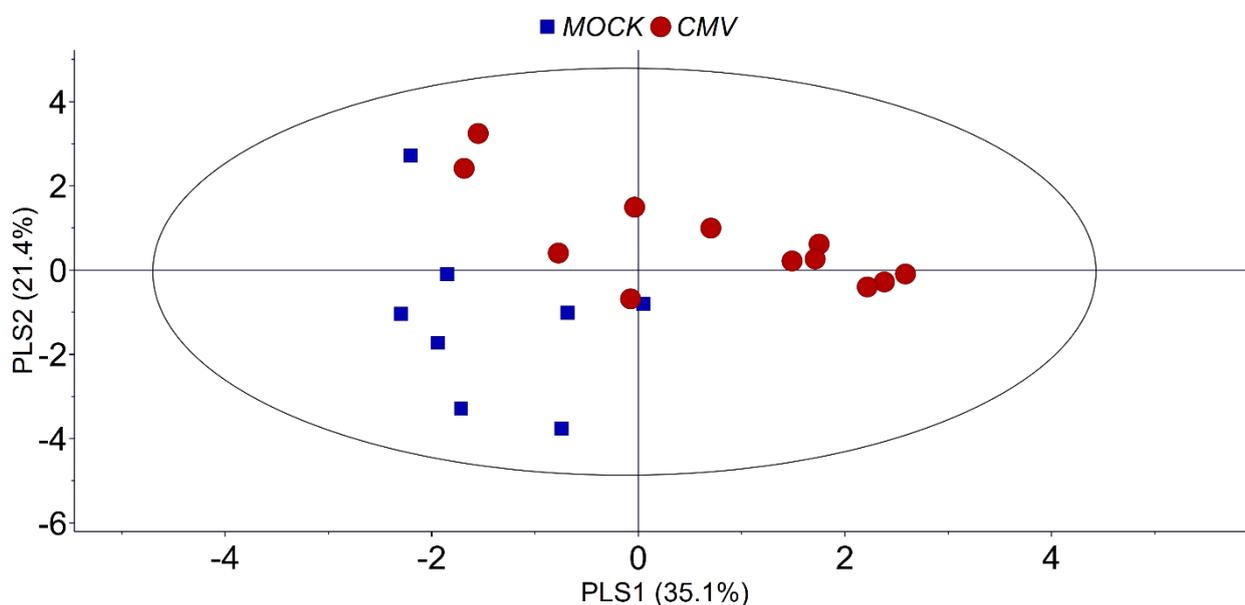
Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων συμπεριφοράς έγινε χρησιμοποιώντας Generalized Linear Models (GLM) με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics version 30.0.0.0. Άτομα που δεν επέλεξαν στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών δεν χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική επεξεργασία.

2.2 Αποτελέσματα

Ανάλυση πτητικών φυτών τομάτας με τον ιό CMV

Οι δυο κύριες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στην υπερκείμενη αέρια φάση των φυτών τομάτας τόσο σε φυτά μάρτυρες όσο και σε ιωμένα φυτά ήταν το β -phelladrene, και το 2- δ -carene, τα οποία αποτελούν περίπου το 75% της εκατοστιαίας σύστασης των ολικών πτητικών. Το συγκεκριμένο προφίλ πτητικών συστατικών είναι παρόμοιο με προφίλ πτητικών που έχει ήδη αναφερθεί σε άλλες μελέτες (Buttery et al., 1997; Kant et al., 2004; Corolovici et al., 2012; De Backer et al., 2015; Anastasaki et al., 2018). Στην υπερκείμενη αέρια φάση των ιωμένων φυτών τομάτας με τον ιό CMV ανευρέθηκαν οι παρακάτω ενώσεις β -elemene, (3E,7E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT), *cis*-methyl-dihydrojasmonate.

Από την ανάλυση της διακριτής ανάλυσης PLS-DA που εφαρμόστηκε, προέκυψαν δύο κύριες συνιστώσες. Στο διάγραμμα διασποράς (scatter plot) του μοντέλου PLS-DA που κατασκευάστηκε αποτυπώνεται ο διαχωρισμός των δειγμάτων από φυτά τομάτας χρησιμοποιώντας τις εκπομπές των πτητικών συστατικών που συλλέχθηκαν από ιωμένα (CMV) και μη (Mock) φυτά. Το μοντέλο έδειξε ότι τα δείγματα μπορούν να διαχωριστούν σύμφωνα με το πτητικό τους προφίλ (Εικόνα 4.9.1-6). Τα αποτελέσματα της ταξινόμησης από την παραπάνω ανάλυση έδειξαν ότι το 90% των δειγμάτων ταξινομήθηκαν σωστά.

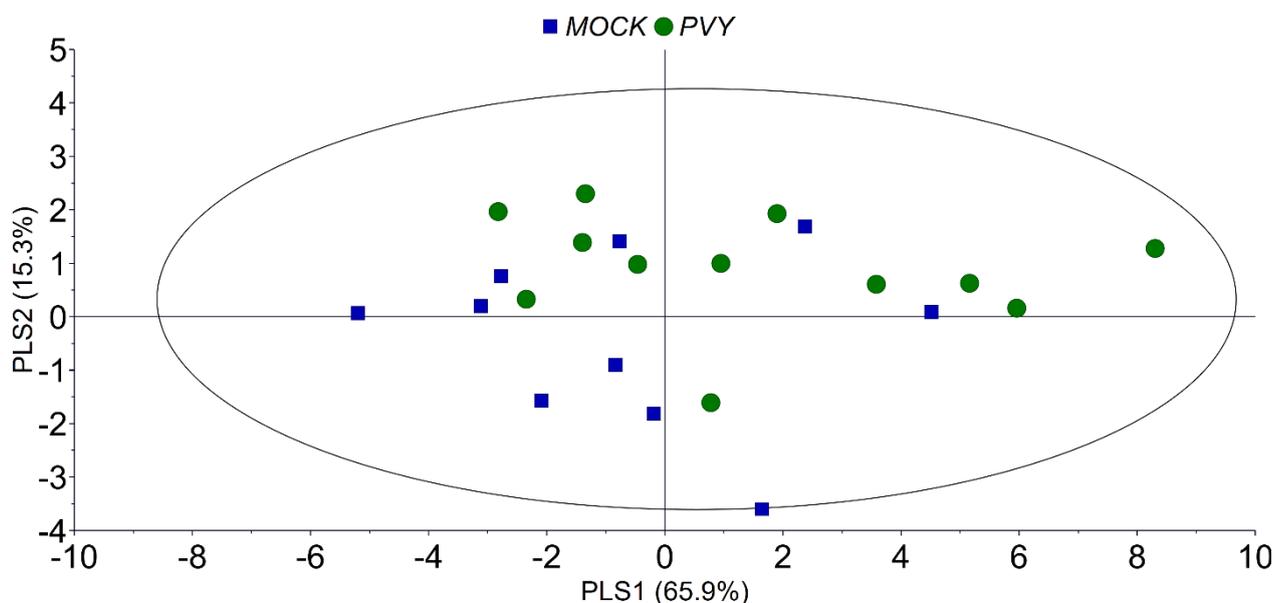


Εικόνα 4.9.1-6: Διάγραμμα διασποράς (scatter plot) του μοντέλου PLS-DA που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις εκπομπές των πτητικών συστατικών ιωμένων φυτών τομάτας (CMV) και φυτών χωρίς ιό (Mock).

Επιπροσθέτως, η στατιστική ανάλυση ανέδειξε ότι οι κύριες ενώσεις που προκαλούν το διαχωρισμό των δειγμάτων ήταν τα σεσκιτερπένια δ - και β -elemene, το β -pinene και ο εστέρας butyl hexanoate.

Ανάλυση πτητικών φυτών τομάτας με τον ιό PVY

Η ανάλυση των πτητικών στο σετ πειραμάτων με μη ιωμένα και ιωμένα φυτά τομάτας με τον ιό PVY, έδειξε αντίστοιχα αποτελέσματα με τις αναλύσεις του σετ με τα ιωμένα με CMV και μη φυτά τομάτας. Η κύρια ένωση ήταν β -phelladrene, ακολουθούμενο από την ένωση 2- δ -carene. Η ένωση hexanal ανευρέθηκε στην υπερκείμενη αέρια φάση μόνο των ιωμένων φυτών τομάτας. Δε διαπιστώθηκαν άλλες ποιοτικές διαφοροποιήσεις μεταξύ ιωμένων και μη φυτών. Στο διάγραμμα διασποράς (scatter plot) του μοντέλου PLS-DA που κατασκευάστηκε αποτυπώνεται ο διαχωρισμός των δειγμάτων από φυτά τομάτας χρησιμοποιώντας τις εκπομπές των πτητικών συστατικών που συλλέχθηκαν από ιωμένα (PVY) και μη (Mock) φυτά (Εικόνα 4.9.1-7). Η παραπάνω ανάλυση έδειξε ότι το ποσοστό των δειγμάτων ταξινομήθηκαν σωστά ήταν μειωμένο (77%) σε σχέση με την ανάλυση των ιωμένων φυτών με CMV.

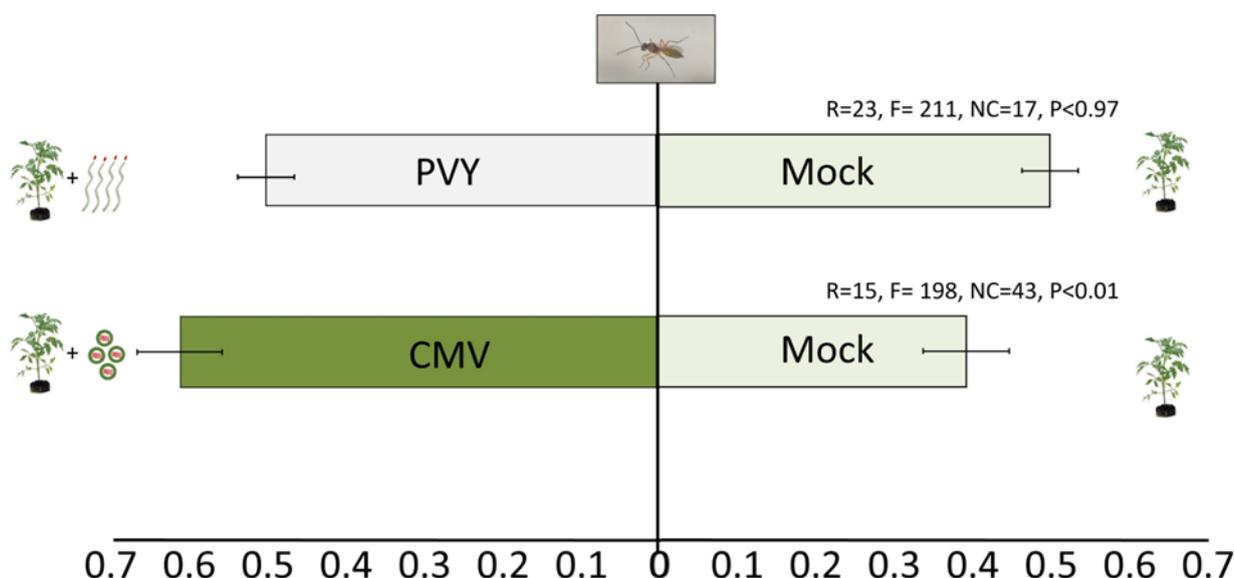


Εικόνα 4.9.1-7: Διάγραμμα διασποράς (scatter plot) του μοντέλου PLS-DA που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις εκπομπές των πτητικών συστατικών ιωμένων φυτών τομάτας (PVY) και φυτών χωρίς ιό (Mock).

Οι κύριες ενώσεις που προκαλούν το διαχωρισμό των δειγμάτων ήταν η nerolidol και butyl hexanoate, nonanal και το τερπένιο camphene.

Βιοδοκιμές συμπεριφοράς

Η στατιστική επεξεργασία των βιοδοκιμών συμπεριφοράς έδειξε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική προσέλκυση του παρασιτοειδούς σε φυτά τομάτας μολυσμένα με τον CMV, χωρίς την παρουσία αφίδων, αλλά όχι σε φυτά τομάτας μολυσμένα με τον PVY (Εικόνα 4.9.1-8).



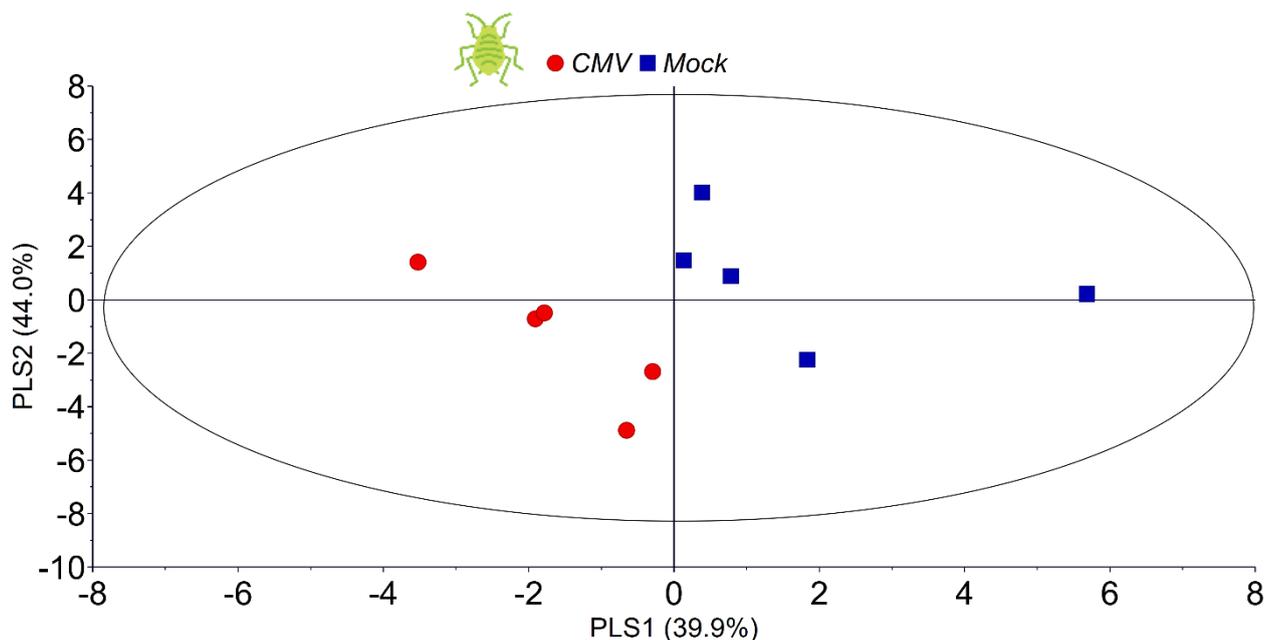
Εικόνα 4.9.1- 8: Απόκριση (%) των παρασιτοειδών *A. colemani* σε πτητικές ουσίες από τα φυτά τομάτας ιωμένα με τους ιούς CMV και PVY και μη (Mock), όπου R= ο αριθμός των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν, F=ο αριθμός των θηλυκών, NC= αριθμός των ενηλίκων που δεν έκαναν επιλογή, $P < 0.05$ υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Ανάλυση πτητικών φυτών πιπεριάς με τον ιό CMV

Η ανάλυση των πτητικών των ιωμένων φυτών πιπεριάς με τον ιό CMV με παρουσία αφίδων, έδειξε ότι το προφίλ χαρακτηριζόταν από ενώσεις που έχουν ήδη αναφερθεί στο αρωματικό προφίλ της πιπεριάς με τον ιό CMV χωρίς την παρουσία αφίδων, όπως τερπένια, limonene, α -pinene και σεσκιτερπένια όπως το β -elemene, β -longipinene (Milonas et al., 2023).

Τόσο στα ιωμένα όσο και στα φυτά μάρτυρες (Mock) ταυτοποιήθηκαν ενώσεις που επάγονται μετά από την προσβολή φυτοφάγων εντόμων, όπως ο εστέρας methyl salicylate και το ομοτερπένια (*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene (DMNT), (*E*, *E*)-4,8,12-trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraene (TMTT). Η τελευταία ένωση είχε ανευρεθεί και σε φυτά ιωμένα με CMV χωρίς την παρουσία αφίδων (Milonas et al., 2023).

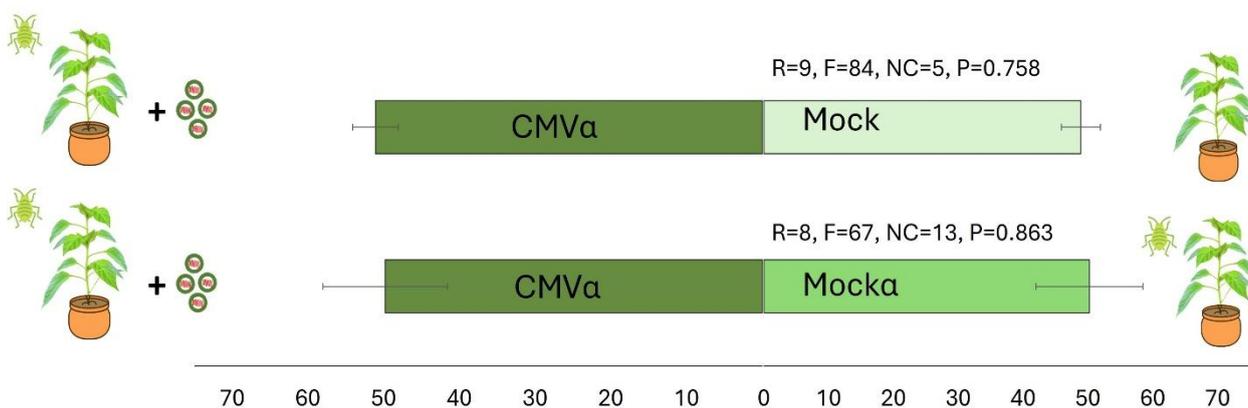
Στο διάγραμμα διασποράς (scatter plot) του μοντέλου PLS-DA που κατασκευάστηκε αποτυπώνεται ο διαχωρισμός των δειγμάτων από φυτά πιπεριάς παρουσία αφίδων χρησιμοποιώντας τις εκπομπές των πτητικών συστατικών που συλλέχθηκαν από ιωμένα (CMV) και μάρτυρες (Mock) φυτά. Το μοντέλο έδειξε ότι τα δείγματα μπορούν να διαχωριστούν σύμφωνα με το πτητικό τους προφίλ (Εικόνα 4.9.1-9). Τα αποτελέσματα της ταξινόμησης από την παραπάνω ανάλυση έδειξαν ότι το 100% των δειγμάτων ταξινομήθηκαν σωστά. Η περαιτέρω στατιστική ανάλυση του μοντέλου έδειξε ότι για το διαχωρισμό η κύρια ένωση ήταν το ομοτερπένιο TMTT.



Εικόνα 4.9.1- 9: Διάγραμμα διασποράς (scatter plot) του μοντέλου PLS-DA που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις εκπομπές των πτητικών συστατικών ιωμένων φυτών πιπεριάς (CMV) και φυτών μάρτυρων-χωρίς ιό (Mock).

Βιοδοκιμές συμπεριφοράς

Στην Εικόνα 4.9.1-10 παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική προσέλκυση του παρασιτοειδούς *A. colemani* σε πτητικά από φυτά πιπεριάς ιωμένα με τον ιό CMV παρουσία αφίδων σε σχέση με τα πτητικά από φυτά μάρτυρες τόσο παρουσία όσο και απουσία αφίδων.



Εικόνα 4.9.1- 10: Απόκριση (%) των παρασιτοειδών *A. colemani* σε πτητικές ουσίες από φυτά πιπεριάς ιωμένα με τον ιό CMV παρουσία αφίδων (CMVa) σε σχέση με φυτά μάρτυρες παρουσία (Mocka) ή απουσία αφίδων (Mock), , όπου R= ο αριθμός των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν, F=ο αριθμός των θηλυκών, NC= αριθμός των ενηλίκων που δεν έκαναν επιλογή, $P < 0.05$ υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός του παραδοτέου ήταν η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών τομάτας και πιπεριάς, ιών (CMV και PVY), αφίδων και παρασιτοειδών, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της επιδημιολογίας των ιών και τον σχεδιασμό ολοκληρωμένων στρατηγικών αντιμετώπισης.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μόλυνση των φυτών τομάτας με τον ιό CMV προκάλεσε αλλαγές στο πτητικό προφίλ του φυτού. Στα φυτά μολυσμένα με CMV εντοπίστηκαν επιπλέον οι ενώσεις β -elemene, TMTT και cis-methyl-dihydrojasmonate, ενώ στα φυτά μολυσμένα με PVY εμφανίστηκε η ένωση hexanal, χωρίς άλλες ποιοτικές διαφοροποιήσεις.

Η μόλυνση από τον ιό προκάλεσε την εκπομπή πτητικών οργανικών ενώσεων, οι οποίες είναι ευρέως γνωστές ως πτητικές ουσίες που επάγονται από φυτοφάγα (HIPVs) (Danner et al. 2018; Menzel et al. 2014) και έχουν επίσης συσχετιστεί με πτητικές ουσίες φυτών που επάγονται από αφίδες (Danner et al. 2018; Sobhy et al. 2017). Επιπλέον η αλλαγή στο πτητικό προφίλ των ιωμένων φυτών τομάτας με τον ιό CMV έγινε αντιληπτή από τα παρασιτοειδή *A. colemani* τα οποία ήταν σε θέση να διακρίνουν μεταξύ μη μολυσμένων και μολυσμένων από ιό CMV, ακόμη και όταν οι αφίδες απουσιάζουν, υπογραμμίζοντας τον ρόλο των ιικών πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών των φυτών.

Στα φυτά πιπεριάς μολυσμένα με CMV παρουσία αφίδων, το πτητικό προφίλ χαρακτηρίστηκε από τερπένια και σεσκιτερπένια γνωστά από προηγούμενες μελέτες, καθώς και από ενώσεις που σχετίζονται με προσβολή από φυτοφάγα έντομα, όπως methyl salicylate, DMNT και TMTT. Η ανάλυση PLS-DA έδειξε πλήρη διαχωρισμό μεταξύ ιωμένων και φυτών μάρτυρων (100% σωστή ταξινόμηση), με το TMTT να αποτελεί την κύρια ένωση-δείκτη του διαχωρισμού. Παρ' όλα αυτά, οι βιοδοκιμές δεν ανέδειξαν στατιστικώς σημαντική προσέλκυση του *A. colemani* από τα πτητικά των ιωμένων φυτών πιπεριάς, είτε παρουσία είτε απουσία αφίδων.

Τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν τη σημασία της μελέτης των πτητικών οργανικών ενώσεων για την κατανόηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών, ιών και παρασιτοειδών, προσφέροντας πολύτιμες πληροφορίες για τον σχεδιασμό αποτελεσματικών στρατηγικών βιολογικής καταπολέμησης των φυτοφάγων εντόμων.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Βιβλιογραφία

Anastasaki E., Drizou F., Milonas P.G. (2018). *Electrophysiological and Oviposition Responses of Tuta absoluta Females to Herbivore-Induced Volatiles in Tomato Plants. Journal of Chemical Ecology*, 44, 288-298.

Bruce, T. J. A. & Pickett, J. A. (2011) *Perception of plant volatile blends by herbivorous insects—Finding the right mix. Phytochemistry* 72, 1605–1611

Danner, H., Deurmont, G. A., Cristescu, S. M. & van Dam, N. M. (2018). *Herbivore-induced plant volatiles accurately predict history of coexistence, diet breadth, and feeding mode of herbivores. New Phytol.* 220, 726–738.

Mauck, K. E., De Moraes, C. M. & Mescher, M. C. (2015). *Infection of host plants by Cucumber mosaic virus increases the susceptibility of Myzus persicae aphids to the parasitoid Aphidius colemani. Sci. Rep.* 5, 1–9.

Menzel, T. et al. (2014). *Synergism in the effect of prior jasmonic acid application on herbivore-induced volatile emission by Lima bean plants: Transcription of a monoterpene synthase gene and volatile emission. J. Exp. Bot.* 65, 4821–4831.

Milonas, P.G., Anastasaki, E., Psoma, A., Partsinevelos, G., Fragkopoulos, G.N., Kektsidou, O., Vassilakos, N., Kapranas, A. (2023). *Plant viruses induce plant volatiles that are detected by aphid parasitoids. Scientific reports*, 13, 8721.

Tack, A. J. M. & Dicke, M. (2013). *Plant pathogens structure arthropod communities across multiple spatial and temporal scales. Funct. Ecol.* 27, 633–645.

Sobhy, I. S. et al. (2017). *cis-Jasmone elicits aphid-induced stress signalling in potatoes. J. Chem. Ecol.* 43, 39–52.