



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

Παραδοτέο Π.4.9.2: Δεδομένα βιοδοκιμών για τη συσχέτιση της προσέλκυσης των παρασιτοειδών με συγκεκριμένες πρωτεΐνες των ιών.

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.9.2**

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	Φυτά- Ιοί- Μολύνσεις- Έντομα	5
2.1.2	Συλλογή πτητικών	7
2.1.3	Αέρια Χρωματογραφία	8
2.1.4	Βιοδοκιμές συμπεριφοράς	9
2.1.5	Στατιστική ανάλυση	10
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 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης συγκεκριμένων ιικών πρωτεϊνών του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) και Υ της πατάτας (potato virus Y, PVY) στην προσέλκυση παρασιτοειδών (*Aphidius colemani* στην τομάτα). Οι πρωτεΐνες των ιών επιλέχθηκαν βάσει της συσχέτισής τους με την προσέλκυση των αφίδων και η έκφραση τους σε φυτά τομάτας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ιικού φορέα έκφρασης, και συγκεκριμένα του ιού του κροταλισματος του καπνού (Tobacco rattle virus, TRV).

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 Y 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. Η προσέλκυση των αφίδων στα μολυσμένα φυτά σχετίζεται με συγκεκριμένες ιικές πρωτεΐνες.

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 ολόένα και περισσότερες ενδείξεις ότι οι παθογόνοι οργανισμοί διαδραματίζουν ρόλο στη διαμόρφωση και την τροποποίηση της συμπεριφοράς των φυσικών εχθρών. Έχουμε πρόσφατα αναφέρει ότι ο φυσικός εχθρός των αφίδων, το παρασιτοειδές είδος *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphelinidae) προσελκύεται από ιωμένα φυτά πιπεριάς με τους παραπάνω ιούς (Milonas et al. 2023). Επιπλέον στο παραδοτέο 4.9.1, τα παρασιτοειδή έδειξαν προτίμηση σε φυτά τομάτας ιωμένα με τον ιό CMV.

Σκοπός του παραδοτέου είναι η διερεύνηση της επίδρασης συγκεκριμένων ιικών πρωτεϊνών του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) και Y της πατάτας (potato virus Y, PVY) στην προσέλκυση παρασιτοειδών (*Aphidius colemani* στην τομάτα). Οι πρωτεΐνες των ιών επιλέχθηκαν βάσει της συσχέτισής τους με την προσέλκυση των αφίδων και η έκφραση τους σε φυτά τομάτας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ιικού φορέα έκφρασης, και συγκεκριμένα του ιού Tobacco rattle virus, TRV.

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 Φυτά- Ιοί- Μολύνσεις- Έντομα

Ετερόλογος ιικός φορέας, φυτικό υλικό και τεχνητές μολύνσεις

Αρχικά έγινε παραγωγή μολύσματος της απομόνωσης PpK20 του ιού του κροταλισματος του καπνού (tobacco rattle virus, TRV) της συλλογής του Εργαστηρίου Ιολογίας, σε φυτά του είδους *Nicotiana glutinosa* μετά από μηχανική τους μετάδοση. Το μόλυσμα χρησιμοποιήθηκε 12-14 ημέρες μετά τη μόλυνση (days post inoculation, dpi).

Για τα πειράματα βιοδοκιμών προσέλκυσης παρασιτοειδών έγινε παραγωγή φυτών τομάτας ποικιλίας ACE 55VF στο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ιολογίας του ΜΦΙ 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 TRV. Η μηχανική μόλυνση πραγματοποιήθηκε με ομογενοποιημένο μολυσμένο ιστό σε αναλογία 1:3 με διάλυμα KPO₄ 0.03M pH 7.4 και 20mg/mL carborundum. Φυτά τομάτας στα οποία πραγματοποιήθηκε η διαδικασία μηχανικής μόλυνσης απουσία ιού αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες (Mock).

Κλωνοποίηση των γονιδίων της CP του CMV ή του PVY στο RNA2 του TRV

Πραγματοποιήθηκαν οι κλωνοποιήσεις στον πλασμιδιακό φορέα P0111 ο οποίος περιέχει το RNA2 του TRV PpK20 σημασμένο με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (MacFarlane και Porovich, 2000) των γονιδίων της καψιδιακής πρωτεΐνης (capsid protein, CP) του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) ή του ιού Y της πατάτας (potato virus Y, PVY), οι οποίες είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην αφιδομετάδοση των ιών.

Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια στόχοι ενισχύθηκαν με ειδικούς υποκινητές και κλωνοποιήθηκαν σε έναν αρχικό πλδασμιδιακό φορέα (Thermofisher, Toro vector). Αυτό έγινε για να διευκολυνθεί στην συνέχεια η πέψη των αλληλουχιών στόχων με συγκεκριμένα ένζυμα περιορισμού. Ακολούθησε καθαρισμός των πλασμιδίων με το κιτ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και αντίδραση πέψης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες KpnI και NcoI. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πράσινη φθορίζουσα χρωστική από τον φορέα P0111 και την ανάκτηση του γονιδίου στόχου από τον φορέα Toro. Λόγω της αντίδρασης των ίδιων ενδονουκλεασών, τόσο τα γονίδια στόχοι όσο και ο φορέας P0111 φέρουν άκρα συμπληρωματικά. Ακολούθησε κλωνοποίηση των γονιδίων στόχων στον φορέα P0111 μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο λιγάση και μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων *E.coli*. Το πλασμίδιο των θετικών αποικιών *E.coli* που επιλέχθηκαν, απομονώθηκε και στάλθηκε για αλληλούχιση κατά Sanger. Η αλληλούχιση επιβεβαίωσε την κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν για την καψιδιακή πρωτεΐνη (CP) του CMV και του PVY στον φορέα TRV P0111 ξεχωριστά.

Δημιουργία μεταγράφων του ανασυνδυσμένου RNA2 του TRV

Τα δυο πλασμίδια (TRV-cpCMV και TRV-cpPVY) που αναφέρθηκαν ανωτέρω απομονώθηκαν με το κιτ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ακολούθησε αντίδραση πέψης με την περιοριστική ενδονουκλάση SmaI με σκοπό την γραμμικοποίηση του φορέα. Το προϊόν της πέψης καθαρίστηκε και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την αντίδραση RNA πολυμερισμού και την παραγωγή μεταγράφων. Η μεταγραφή των γραμμικών πλέον πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε με το κιτ Megascript T7 kit (ThermoFisher) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αρχική ποσότητα του ολικού πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο ήταν περίπου 1μg ενώ μετά την αντίδραση της μεταγραφής η συγκέντρωση μεταγράφων ήταν περίπου 5300 και 5150 μg/μL για το TRV-cpCMV και TRV-cpPVY, αντίστοιχα.

Παραγωγή μολύσματος του ανασυνδυσμένου TRV φορέα

Μη πολλαπλασιαζόμενο (non-multiplying, NM) στέλεχος του TRV, το οποίο περιλαμβάνει μόνο το RNA1 του ιού αναμιχθηκε σε ίση ποσότητα με τα μετάγραφα του ανασυνδυσμένου RNA2 και στο μίγμα προστέθηκε διάλυμα KPO₄ 0.03M pH 7.4 με 0.1% w/v μπεντονίτη. Ακολούθησε επίπαση φυτών *Nicotiana benthamiana* με carbogundum και μηχανική μόλυνση με τριβή. Τα φύλλα μόλυνσης καθώς και τα κορυφαία φύλλα των φυτών ελέγχθηκαν έπειτα από 8 και 13 ημέρες με ανοσοδοκιμή ELISA με εμπορικά κιτ της εταιρείας LOEWE® Biochemica GmbH Γερμανίας για να επιβεβαιωθεί η παρουσία του TRV και η έκφραση της καψιδιακής πρωτεΐνης του CMV ή του PVY. Τα φυτά *N. benthamiana* που ήταν θετικά στον TRV και στον CMV ή PVY χρησιμοποιήθηκαν ως μόλυσμα για φυτά τομάτας και ακολουθήθηκε η διαδικασία τεχνητής μόλυνσης όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα φυτά διατηρούταν στο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ιολογίας του ΜΦΙ υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού (20-26°C, φωτοπερίοδος 16 h φως /8 h σκοτάδι) (Εικόνα 4.9.2-1). Για κάθε μεταχείριση προετοιμαζόταν 10 φυτά. Συνολικά η προετοιμασία φυτών για κάθε μεταχείριση επαναλήφθηκε έξι φορές (συνολικός αριθμός φυτών ανα μεταχείριση 60).



Εικόνα 4.9.2-1: Φυτά τομάτας στο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ιολογίας προσβεβλημένα από τον ιό TRV που φέρει τις καψιδιακές πρωτεΐνες CMV (A) και φυτό χωρίς μεταχείριση- Mock (B)

Έντομα

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 φωτοπεριόδου (16 ώρες φως/8 ώρες σκότος), στο εντομοτροφείο του εργαστηρίου Βιολογικής Καταπολέμησης.

Οι βιοδοκιμές συμπεριφοράς με ολφακτόμετρο τύπου Υ πραγματοποιήθηκαν με φυτά που ήταν 14 έως 21 ημέρες μετά την μόλυνση.

Μετά την ολοκλήρωση των βιοδοκιμών, 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 Συλλογή πτητικών

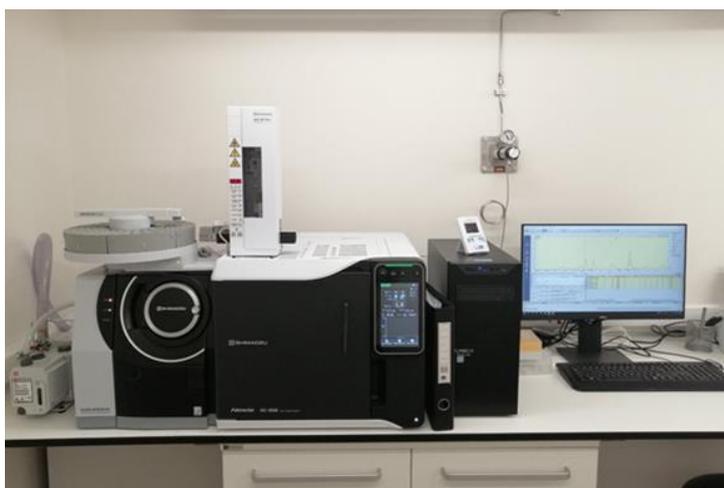
Για την παραλαβή των πτητικών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κατανομής στην υπερκείμενη αέρια φάση σύμφωνα με τους Anastasaki et al., (2018). Τα φυτά τοποθετούταν σε θαλάμους (Εικόνα 4.9.2-2), όπου το χώμα καλυπτόταν με αλουμινόχαρτο. Ο αέρας εισχωρούσε στο θάλαμο αφού προηγουμένως διερχόταν από φίλτρο 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 αποτελούταν 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 4.9.2-2: Θάλαμοι συλλογής πτητικών με φυτά τομάτας (Α) που φέρουν ιικές πρωτεΐνες PVY στον ετερόλογο φορέα TRV (TRV/CP^{PVY}), (Β) ιωμένα με TRV και (Γ) μάρτυρας (Mock).

2.1.3 Αέρια Χρωματογραφία

Τα δείγματα αναλύθηκαν με αέριο χρωματογράφο Shimadzu Nexis GC-2030 (Εικόνα 4.9.2-3) 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 °C. Το ήλιο (He) χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με σταθερή ροή 1 mL min⁻¹. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης ξεκινούσε από τους 50 °C όπου παρέμενε για 5 min και σταδιακά με ρυθμό 3 °C min⁻¹ έφτανε τους 170°C. Στη συνέχεια, με ρυθμό 20 °C min⁻¹ έφτανε την τελική θερμοκρασία των 250 °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 °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 4.9.2-3: 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 (C₈-C₂₀) 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, 2023. 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 (Εικόνα 4.9.2-4). Ο χρόνος αναμενόμενης ανταπόκρισης του εντόμου ήταν 5 λεπτά. Θηλυκά ενήλικα άτομα ηλικίας 1-2 ημερών χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 9 φυτά και για κάθε φυτό 10 παρασιτοειδή.



Εικόνα 4.9.2-4: 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 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

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές βιοδοκιμές συμπεριφοράς του *A. colemani* με τη χρήση ολφακτομέτρου τύπου Y σε φυτά που έφεραν τον ιό Tobacco rattle virus, (TRV), ώστε αυτός να χρησιμοποιηθεί ως δυνητικός ετερόλογος φορέας για την έκφραση των ιικών πρωτεϊνών των CMV και PVY.

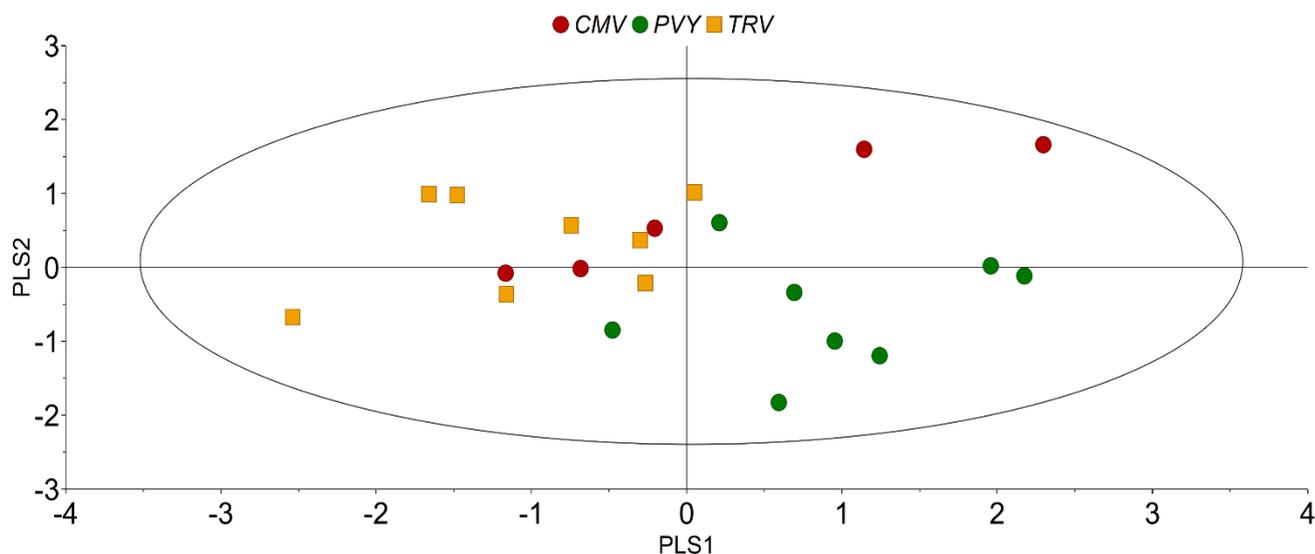
Οι βιοδοκιμές συμπεριφοράς έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική προσέλκυση του παρασιτοειδούς σε φυτά τομάτας μολυσμένα με TRV (GLM, *Wald* $\chi^2(1) = 3.62, p = 0.057$). Με την επιβεβαίωση της μη προσέλκυσης του παρασιτοειδούς από ιωμένα TRV φυτά, προχωρήσαμε στην κλωνοποίηση των γονιδίων των καψιδιακών πρωτεϊνών (capsid protein, CP) των PVY και CMV στον TRV φορέα.

Ανάλυση πτητικών φυτών τομάτας

Η ανάλυση των πτητικών σε όλες τις επεμβάσεις ιωμένων φυτών (TRV/CP^{CMV}, TRV/CP^{PVY} και TRV) και του μάρτυρα, έδειξε αντίστοιχα αποτελέσματα με τις αναλύσεις της υπερκείμενης αέριας φάσης σε φυτά τομάτας του παραδοτέου 4.9.1. Η κύρια ένωση σε όλα τα φυτά ήταν β -rhelladrene, ακολουθούμενο από την ένωση 2- δ -carene.

Χαρακτηριστική ένωση που ανιχνεύθηκε σε όλες τις επεμβάσεις μόνο των ιωμένων φυτών (TRV/CP^{CMV}, TRV/CP^{PVY} και TRV) ήταν η ένωση methyl salicylate (MeSA). Η ένωση MeSA ανευρίσκεται σε πλήθος φυτών (Kant et al., 2009). Επάγεται ή ενισχύεται μετά από προσβολή από φυτοφάγα μέσω του μεταβολικού μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος (SA) μετά από προσβολή από φυτοφάγα έντομα και συγκαταλέγεται ως herbivore-induced plant volatiles (HIPVs). Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η μόλυνση με ιούς επάγει στα φυτά μηχανισμούς άμυνας και έκλυση πτητικών ενεργοποιώντας αντίστοιχα μεταβολικά μονοπάτια όπως αυτό του σαλικυλικού οξέος (SA).

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 TRV/CP^{CMV}, TRV/CP^{PVY} και TRV. Το μοντέλο έδειξε ότι τα δείγματα μπορούν να διαχωριστούν σύμφωνα με το πτητικό τους προφίλ (Εικόνα 4.9.2-5). Τα αποτελέσματα της ταξινόμησης από την παραπάνω ανάλυση έδειξαν ότι το 80,95% των δειγμάτων ταξινομήθηκαν σωστά.



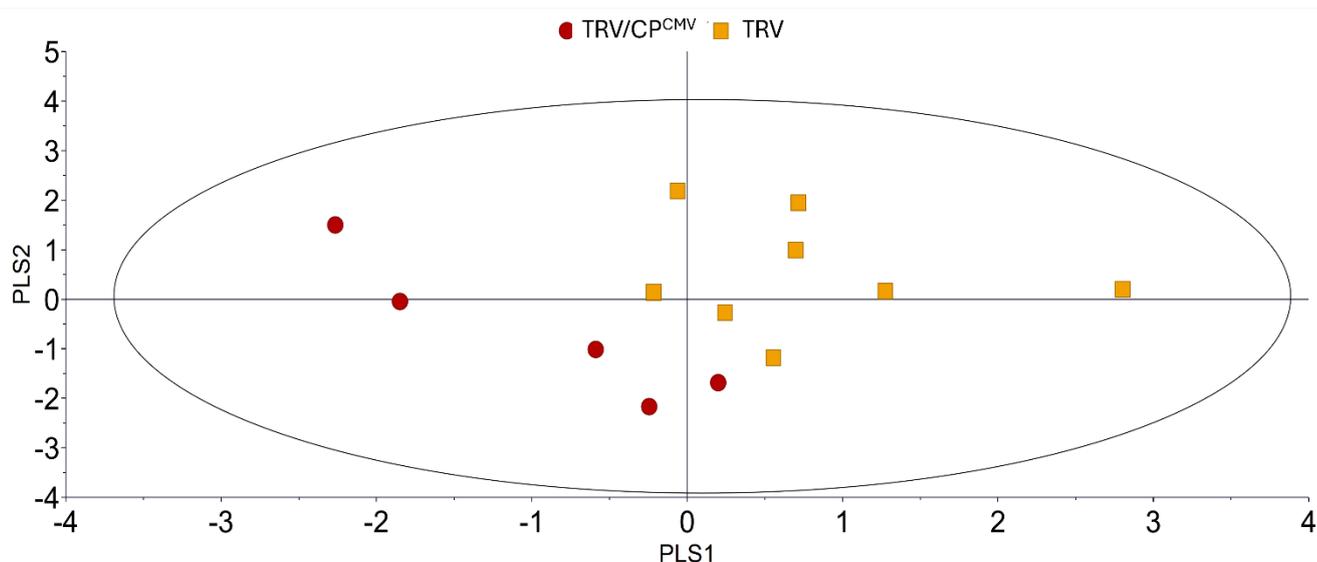
Εικόνα 4.9.2-5: Διάγραμμα διασποράς (scatter plot) του μοντέλου PLS-DA που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις εκπομπές των πτητικών συστατικών ιωμένων φυτών τομάτας με TRV/CP^{CMV}, TRV/CP^{PVY} και TRV.

Πραγματοποιήθηκαν επίσης συγκρίσεις ανά ζεύγη. Στις εικόνες 4.9.2-6 και 4.9.2-7 παρουσιάζονται τα διαγράμματα διασποράς μεταξύ φυτών τομάτας που προσβλήθηκαν από CMV και TRV, καθώς και μεταξύ PVY και TRV, με τα αποτελέσματα σωστής

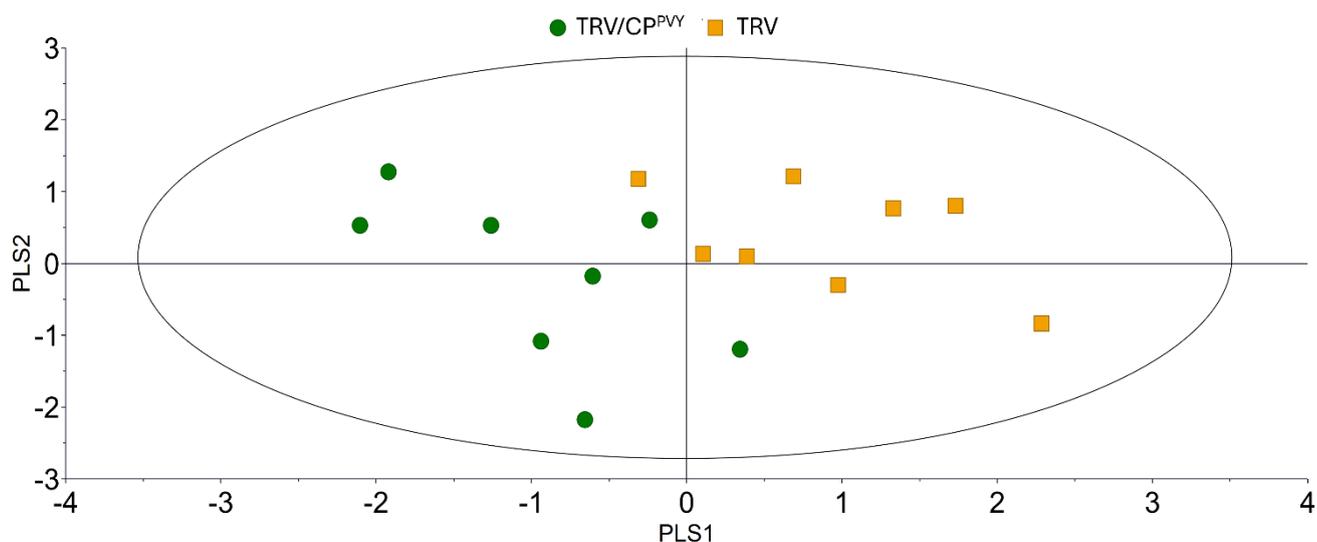
ταξινόμησης να ανέρχονται στην περίπτωση στο 100% και στην άλλη στο 93,75%.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι ενώσεις MESA, β -pinene, E- β -ocimene, *trans*-carγoryllene, όπως και 2 άγνωστα σесκικετηρηπενια είναι τα κύρια συστατικά που συνεισφέρουν περισσότερο στην ταξινόμηση των φυτών τομάτας ιωμένων με CMV και TRV.

Στην περίπτωση του διαχωρισμού μεταξύ PVY και TRV, τα συστατικά που συμμετέχουν στο διαχωρισμό των δειγμάτων είναι εκ νέου η ένωση MeSA καθώς και αλκάνια.



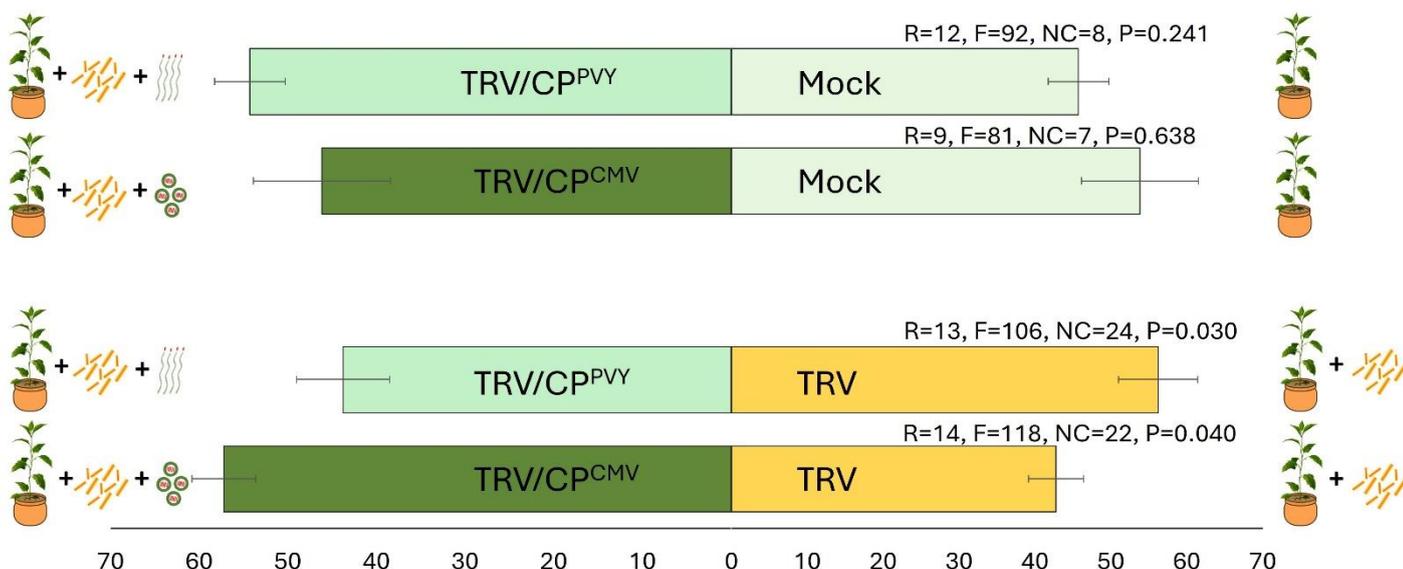
Εικόνα 4.9.2-6: Διάγραμμα διασποράς (scatter plot) του μοντέλου PLS-DA που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις εκπομπές των πτητικών συστατικών ιωμένων φυτών τομάτας με TRV/CP^{CMV}, και TRV.



Εικόνα 4.9.2-7: Διάγραμμα διασποράς (scatter plot) του μοντέλου PLS-DA που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις εκπομπές των πτητικών συστατικών ιωμένων φυτών τομάτας με TRV/CP^{PVY} και TRV.

Βιοδοκιμές συμπεριφοράς

Η στατιστική επεξεργασία των βιοδοκιμών συμπεριφοράς έδειξε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική προσέλκυση του παρασιτοειδούς σε φυτά τομάτας μολυσμένα με τον ιό TRV ο οποίος φέρει καψιδιακές πρωτεΐνες του ιού CMV (TRC/CP^{CMV}), σε σχέση με αυτά που ήταν απλά ιωμένα με τον ιό TRV ($Wald \chi^2(1) = 4.234, p = 0.040$), (Εικόνα 4.9.2-8). Αντίθετα στην περίπτωση των φυτών που φέρουν καψιδιακές πρωτεΐνες του ιού PVY παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική απώθηση ($Wald \chi^2(1) = 4.686, p = 0.030$).



Εικόνα 4.9.2- 8: Απόκριση (%) των παρασιτοειδών *A. colemani* σε πτητικές ουσίες από τα φυτά τομάτας ιωμένα με τον ιό TRV, ο οποίος φέρει καψιδιακές πρωτεΐνες των ιών CMV (TRV/CP^{CMV}) και PVY (TRY/CP^{PVY}) συγκρίνοντας με φυτά μάρτυρα (Mock) και με φυτά ιωμένα μόνο τον ιό TRV, 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.

Στις μεταχειρίσεις μεταξύ ιωμένων φυτών και των μαρτύρων (Mock) δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική προσέλκυση στα παρασιτοειδή.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο παρόν παραδοτέο διερευνήθηκε η επίδραση τροποποιημένων φορέων του ιού Tobacco rattle virus (TRV) που εκφράζουν καψιδιακές πρωτεΐνες των ιών CMV και PVY, στην παραγωγή πτητικών ενώσεων και στην προσέλκυση του παρασιτοειδούς *Aplidius colemani*. Αρχικά, οι βιοδοκιμές συμπεριφοράς με χρήση ολφακτομέτρου τύπου Y έδειξαν ότι τα φυτά μολυσμένα με TRV δεν προσελκύουν στατιστικώς σημαντικά το παρασιτοειδές. Με την επιβεβαίωση της μη προσέλκυσης, προχωρήσαμε στην κλωνοποίηση των γονιδίων των καψιδιακών πρωτεϊνών των CMV και PVY

Η ανάλυση των πτητικών ουσιών των φυτών έδειξε ότι η κύρια ένωση σε όλες τις μεταχειρίσεις ήταν η β -phelladrene, ακολουθούμενη από την 2- δ -carene. Μια χαρακτηριστική ένωση που ανιχνεύθηκε αποκλειστικά σε ιωμένα φυτά ήταν η ένωση methyl salicylate (MeSA). Ο συγκεκριμένος εστέρας είναι γνωστό ότι συνδέεται με την ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος και αποτελεί τυπική ένωση herbivore-induced plant volatile (HIPV). Η παρουσία του MeSA υποδηλώνει ότι η ιική μόλυνση επάγει στα φυτά μηχανισμούς άμυνας παρόμοιους με εκείνους που επάγονται από φυτοφάγα έντομα.

Η διακριτή ανάλυση PLS-DA έδειξε ότι τα φυτά μολυσμένα με διαφορετικούς ιούς ή ιογενείς φορείς μπορούν να διαχωριστούν αποτελεσματικά βάσει του πτητικού προφίλ, με σωστή ταξινόμηση 80,95% συνολικά, ενώ σε συγκρίσεις ανά ζεύγη τα ποσοστά σωστής ταξινόμησης ήταν 100% για CMV vs TRV και 93,75% για PVY vs TRV. Οι ουσίες που συνεισέφεραν περισσότερο στον διαχωρισμό ήταν η MeSA, β -pinene, *E*- β -ocimene, *trans*-caryophyllene και δύο άγνωστα σεσκιτερπένια για CMV vs TRV, ενώ για PVY vs TRV κυριάρχησαν η MeSA και αλκάνια.

Οι βιοδοκιμές συμπεριφοράς έδειξαν ότι οι αλλαγές στο πτητικό προφίλ μεταφράζονται σε ουσιαστικές διαφοροποιήσεις στη συμπεριφορά του *A. colemani*. Συγκεκριμένα, τα φυτά τομάτας που έφεραν τον TRV με καψιδιακή πρωτεΐνη του CMV (TRV/CP^{CMV}) προκάλεσαν στατιστικώς σημαντική προσέλκυση του παρασιτοειδούς σε σύγκριση με φυτά μολυσμένα μόνο με TRV. Αντίθετα, τα φυτά που εξέφραζαν την καψιδιακή πρωτεΐνη του PVY (TRV/CP^{PVY}) προκάλεσαν στατιστικώς σημαντική απώθηση. Στις συγκρίσεις μεταξύ ιωμένων φυτών TRV με καψιδιακές πρωτεΐνες των ιών CMV PVY και φυτών-μαρτύρων δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Συνοψίζοντας, οι καψιδιακές πρωτεΐνες διαφορετικών ιών μπορούν να επηρεάσουν με διαφορετικό τρόπο τη χημική επικοινωνία των φυτών και τη συμπεριφορά ωφέλιμων εντόμων, αναδεικνύοντας το ρόλο των ιών στις τριτροφικές αλληλεπιδράσεις. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η τροποποίηση των φυτικών πτητικών μέσω έκφρασης ιικών πρωτεϊνών μπορεί να αξιοποιηθεί για τη βελτίωση της βιολογικής καταπολέμησης φυτοφάγων εντόμων, ενεργοποιώντας μηχανισμούς άμυνας και προσελκύνοντας ωφέλιμα παρασιτοειδή.

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

Kant, M., Bleeker, P.M., Van Wijk, M., Schrink, R.C., Haring, M. (2009). *Plant Volatiles in Defence. In Advances in Botanical Research; van Loon, L.C., Ed.; Academic Press: London, UK, Volume 51, pp. 613–666.*

MacFarlane, S.A., Popovich, A.H. (2000). *Efficient expression of foreign proteins in roots from tobnavirus vectors. Virology* 267, 29–35. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0098>

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.