

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ

**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



Διδακτορική διατριβή

**Χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεύζας
των εσπεριδοειδών στην Κύπρο και διερεύνηση νέων
τρόπων αντιμετώπισης του**

Θεοδώρα Καπαρή

Λεμεσός, Σεπτέμβριος 2016

Έντυπο έγκρισης

Διδακτορική διατριβή

Χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο και διερεύνηση νέων τρόπων αντιμετώπισης του

Παρουσιάστηκε από
Θεοδώρα Καπαρή

Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτρης Τσάλτας, Αναπληρωτής Καθηγητής Σχολής Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείρισης Περιβάλλοντος, ΤΕΠΑΚ
Υπογραφή _____

Μέλος επιτροπής: Νικολαος Κατής, Καθηγητής Σχολής Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
Υπογραφή _____

Μέλος επιτροπής: Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής Γεωπονικού πανεπιστημίου Αθηνών
Υπογραφή _____

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου
Λεμεσός, Σεπτέβριος 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Θεοδώρα Καπαρή, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείρισης Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

ΑΦΙΕΡΩΣΗ

Η μελέτη αυτή αφιερώνεται στην Δρα Αναστασία Κυριακού,
την πρώτη ιολόγο εσπεριδοειδών της Κύπρου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο ιός της τριστεζας (*Citrus tristeza virus*) προκαλεί την πιο καταστροφική ασθένεια των εσπεριδοειδών σε όλο τον κόσμο και στην Κύπρο όπου η ουσιαστική αντιμετώπιση της άρχισε το 1992 με την εφαρμογή ειδικού Σχεδίου. Η αντιμετώπιση του ιού με εκριζώσεις των ιωμένων δένδρων ή/και φυτειών θεωρήθηκε εφικτή αφού το ποσοστό προσβολής ήταν χαμηλό (4,07%) και ο φορέας μετάδοσης του ιού είναι η αφίδα *Aphis gossypii*. Η απουσία από την νήσο του κύριου και αποτελεσματικότερου φορέα μετάδοσης της τριστεζας, της αφίδας *Toxoptera citricida*, επιτρέπει στο παρόν στάδιο τον έλεγχο της ασθένειας με εφαρμογή εκριζώσεων. Η πρόσφατη όμως εμφάνιση της αφίδας *Toxoptera citricida* στην Πορτογαλλία είναι ανησυχητική, αφού η ύπαρξη της αφίδας αυτής σε μια χώρα αλλάζει ριζικά τον τρόπο αντιμετώπισης της τριστεζας και η ασθένεια σ' αυτή την περίπτωση λαμβάνει την μορφή επιδημίας.

Γενικός στόχος της διατριβής ήταν η ενδελεχής μελέτη της ασθένειας της τριστεζας και των τρόπων αντιμετώπισης της. Ειδικοί στόχοι ήταν: 1) ο χαρακτηρισμός και ο καθορισμός της σοβαρότητας απομονώσεων του ιού της τριστεζας από όλη την Κύπρο με βιολογικές και μοριακές μεθόδους, 2) η διερεύνηση της δυνατότητας εφαρμογής σταυροειδούς προστασίας (cross protection) με χρήση ήπιων τοπικών φυλών του ιού, 3) η διερεύνηση της δυνατότητας ανάπτυξης *in vitro* μεθόδων διάγνωσης του ιού, και 4) η βελτιστοποίηση μεθόδων εξυγίανσης δενδρυλλίων προσβεβλημένων με τριστεζα με χρήση θερμοθεραπείας, χημειοθεραπείας και μεριστωματικής καλλιέργειας.

Τα αποτελέσματα της διατριβής κατέδειξαν τον βαθμό σοβαρότητας της ασθένειας σε σχέση με την διερεύνηση των φυλών του ιού που υπάρχουν στο νησί και έδωσαν την δυνατότητα συλλογής ήπιων τοπικών απομονώσεων του ιού οι οποίες θα είναι πολύτιμες για μελλοντική αντιμετώπιση της ασθένειας σε περίπτωση εισόδου της *Toxoptera citricida*. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη μεθόδων για σύντομη διάγνωση και εξυγίανση δίνουν εργαλεία για αρτιότερη αντιμετώπιση του ιού της τριστεζας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται σε όσους εργάστηκαν ή βοήθησαν με οποιοδήποτε τρόπο στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

Ο Δρ Λάμπρος Παπαγιάννης, μοριακός φυτοπαθολόγος στο Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών (ΙΓΕ), βοήθησε στην διεξαγωγή των πειραμάτων μοριακής ταυτοποίησης, μελέτησε την εργασία και έκανε εισηγήσεις.

Η Δρ Αναστασία Κυριακού, έδωσε πολύτιμες συμβουλές σε θέματα ιολογίας εσπεριδοειδών, μελέτησε την εργασία και έκανε εισηγήσεις.

Οι καθηγητές του ΤΕΠΑΚ Νίκος Ιωάννου και Δημήτρης Τσάλτας είχαν την επίβλεψη της εργασίας.

Ο καθηγητής Νίκος Κατής της Σχολής Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και ο καθηγητής Επαμεινώνδας Παπλωματάς του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, μελέτησαν την εργασία και έκαναν εισηγήσεις.

Ο καθηγητής Ανδρέας Βολουδάκης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, συνεργάστηκε αναφορικά με την εξυγίανση πολλαπλασιαστικού υλικού.

Ο Λειτουργός του ΙΓΕ Νίκος Σεραφείδης έδωσε συμβουλές σε θέματα Εντομολογίας και οι Λειτουργοί Σοφοκλής Γρηγορίου και Αγγελος Κυρατζής βοήθησαν σε θέματα στατιστικών αναλύσεων.

Για την διεκπεραίωση των εργασιών είχαν συνεισφορά οι τεχνικοί του ΙΓΕ Δημήτρης Κωνσταντίνου, Γιάννης Μάρκου, Αρτεμης Χατζηνικολή, Ανδρέας Χατζηνικολής, Ειρήνη Χάρκου, Χρήστος Δημητρίου και Ελένη Ασιώτου καθώς και ο Γιώργος Σάββας από το Τμήμα Γεωργίας.

Η διευθύντρια του ΙΓΕ, Δρ Δώρα Χειμωνίδου και οι υποδιευθυντές Μαρίνος Μάρκου και Πολύκαρπος Πολυκάρπου, συνέβαλαν στην απρόσκοπτη διεξαγωγή του έργου με διευθετήσεις που παρείχαν.

Η διευθύντρια του Τμήματος Γεωργίας, Δρ Ανδρούλλα Γεωργίου, και Λειτουργοί Κλάδου Φυτοπροστασίας, Φυτωρίου Κουκλιών και Επαρχιακών Γεωργικών Γραφείων συνέβαλαν στην απρόσκοπτη διεξαγωγή του έργου με διευθετήσεις που παρείχαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός της τριστεζας των εσπεριδοειδών είναι σήμερα διαδεδομένος σε όλη την Κύπρο και προκαλεί μια από τις πιο σοβαρές ασθένειες στα εσπεριδοειδή. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν για πρώτη φορά με βιολογικές και μοριακές μεθόδους τον βαθμό σοβαρότητας της ασθένειας στο νησί όπου το ποσοστό των ήπιων φυλών του ιού (58%) υπερτερεί σε σχέση με το ποσοστό των μετρίως σοβαρών (32%) και σοβαρών φυλών (10%). Αναπτύχθηκαν δύο καινοτόμες και ταχείες εργαστηριακές *in vitro* μέθοδοι βιολογικής ανίχνευσης του ιού της τριστεζας, καθώς και βιολογικού διαχωρισμού ήπιων και σοβαρών απομονώσεων του ιού. Μελετήθηκε για πρώτη φορά στην Κύπρο η μέθοδος της σταυροειδούς προστασίας με χρήση δύο ήπιων τοπικών απομονώσεων του ιού και τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά για προστασία δενδρυλλίων Washington navel εμβολιασμένων σε κιτρομηλιά από μετέπειτα προσβολή με σοβαρή απομόνωση. Μελετήθηκαν διάφοροι μέθοδοι εξυγίανσης του ιού της τριστεζας και των ιοειδών των εσπεριδοειδών και καταδείχθηκε ότι ο συνδυασμός συγκεκριμένων μεθόδων εξυγίανσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αρτιότερη παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών. Αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος για εξυγίανση των ιοειδών των εσπεριδοειδών με θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών *in vitro* στους 4°C για 5 βδομάδες προσβεβλημένων μικρομοσχευμάτων και μικροεμβολιασμό. Η χρήση της ριμπαβιρίνης για χημειοθεραπεία *in vitro* και η θερμοθεραπεία δενδρυλλίων αυξάνει το ποσοστό εξυγίανσης του πολλαπλασιαστικού υλικού που είναι προσβεβλημένο με τον ιό της τριστεζας.

Λέξεις κλειδιά: Τριστεζα, απομονώσεις, σταυροειδής προστασία, εξυγίανση.

ABSTRACT

Citrus tristeza virus (CTV) is an important citrus pathogen in Cyprus. Biological and molecular characterization of several local CTV isolates, indicated that mild, medium severe and severe symptom inducing isolates co exist in the island, with an incidence of 58%, 32% and 10% respectively. In view of this study, a new laboratory technique combining shoot-tip grafting *in vitro* and biological indexing on Mexican lime was explored for the detection of CTV. A new quick laboratory technique was developed for the biological separation of mild and severe CTV isolates *in vitro*. The cross protection method was studied for first time in Cyprus by the use of two local CTV isolates and the results were proved that the mild isolates could protect Washington navel trees grafted on sour orange from a severe CTV isolate. In addition, a new method for elimination of viroids in citrus by the use of cryotherapy of infected microcuttings at 4°C for 5 weeks *in vitro* and micrografting was explored. Elimination of CTV was succeed by the use of thermotherapy, ribavirin *in vitro* and micrografting.

Key words: Citrus tristeza virus (CTV), isolates, cross protection, elimination.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	5
Ευχαριστίες	6
Περίληψη.....	7
Abstract	8
Κατάλογος Πινάκων.....	15
Κατάλογος Εικόνων.....	17
Κατάλογος Σχημάτων.....	21
Συντομογραφίες.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	24
1.1. Ο ιός της τριστεζας των εσπεριδοειδών (Citrus tristeza virus).....	24
1.1.1. Ιδιότητες του ιού της τριστεζας.....	24
1.1.2. Μετάδοση του ιού της τριστεζας.....	25
1.1.3. Ασθένειες που προκαλεί ο ιός.....	27
1.1.4. Συμπτώματα.....	28
1.1.5. Φυλές ή στελέχη του ιού.....	31
1.2. Η τριστεζα των εσπεριδοειδών στην Κύπρο.....	31
1.2.1. Εισαγωγή του ιού της τριστεζας στην Κύπρο.....	31
1.2.2. Σχέδιο για αντιμετώπιση του ιού της τριστεζας στην Κύπρο (1992-2006).....	32
1.2.3. Επισκόπηση των εσπεριδοειδών για εντοπισμό του ιού της τριστεζας στην Κύπρο και εργαστηριακός έλεγχος.....	34
1.2.4. Αποτελέσματα της επισκόπησης για τον ιό της τριστεζας.....	35
1.3. Υποκείμενα εσπεριδοειδών ανεκτικά στον ιό της τριστεζας.....	36
1.4. Ιολογικές και συναφείς ασθένειες εσπεριδοειδών (εκτός της τριστεζας).....	39
1.4.1. Εξάπλωση των ιολογικών ασθενειών των εσπεριδοειδών.....	42
1.4.2. Αντιμετώπιση ιολογικών και συναφών ασθενειών των εσπεριδοειδών.....	43

1.5.	Ιολογικές και συναφείς ασθένειες των εσπεριδοειδών στην Κύπρο.....	44
1.5.1.	Τριστέζα (σημείο 1.1).....	44
1.5.2.	Ψώρωση.....	44
1.5.3.	Μολυσματική ποικιλόχρωση.....	46
1.5.4.	Πέτρωμα ή Λιθίαση.....	46
1.5.5.	Ιοειδή.....	47
1.6.	Ιολογικές και συναφείς ασθένειες των εσπεριδοειδών που δεν υπάρχουν στην Κύπρο.....	50
1.6.1.	Πρασίνισμα των εσπεριδοειδών ή Ασθένεια του Κίτρινου Δράκου (Greening η Huanglongbing).....	50
1.6.2.	Ξαφνικός θάνατος εσπεριδοειδών (Citrus sudden death).....	54
1.6.3.	Θανατικό (Declinio-Blight).....	55
1.7.	Εξυγίανση και Παραγωγή Υγιούς Πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών.....	55
1.8.	Στόχοι της διατριβής.....	58
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		59
2.1.	Βιολογική μέθοδος ανίχνευσης του ιού της τριστέζας.....	59
2.2.	Βιολογική μέθοδος διάγνωσης του ιού της τριστέζας.....	61
2.3.	Ορολογική μέθοδος-ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA.....	64
2.4.	Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστέζας.....	68
2.4.1.	Επεξεργασία και αποθήκευση των απομονώσεων του ιού της τριστέζας πριν την μοριακή ταυτοποίηση.....	68
2.4.2.	Προετοιμασία των δειγμάτων για τις μοριακές δοκιμές ανίχνευσης.....	70
2.4.2.1.	Απομόνωση ολικού RNA.....	70
2.4.3.	Μοριακή ενίσχυση του γονιδίου της καμινδικής πρωτεΐνης κυπριακών απομονώσεων του CTV με RT-PCR.....	71
2.4.4.	Μοριακή κλωνοποίηση και προσδιορισμός της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας.....	72
2.4.5.	Επεξεργασία Μοριακών δεδομένων και Φυλογενετικές αναλύσεις.....	74

2.5. Μέθοδοι εξυγίανσης πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών.....	74
2.5.1. Τεχνική θερμοθεραπείας.....	75
2.5.2. Θερμοθεραπεία <i>in vitro</i>	75
2.5.3. Θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών <i>in vitro</i>	75
2.5.4. Τεχνική ιστοκαλλιέργειας.....	76
2.5.5. Η τεχνική του μικροεμβολιασμού.....	77
2.5.6. Χημειοθεραπεία <i>in vitro</i>	82
2.5.7. Συνδυασμός των διαφόρων μεθόδων εξυγίανσης.....	82
2.6. Καταγραφή μετρήσεων και παρατηρήσεων πειραμάτων.....	82
2.7. Στατιστική Ανάλυση.....	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ...	84
3.1. Περίληψη.....	84
3.2. Εισαγωγή.....	85
3.3. Υλικά και Μέθοδοι.....	90
3.3.1. Συλλογή απομονώσεων του ιού της τριστεζας.....	90
3.3.2. Βιολογικός χαρακτηρισμός των 50 απομονώσεων.....	90
3.4. Αποτελέσματα.....	91
3.4.1. Συλλογή απομονώσεων του ιού της τριστεζας.....	91
3.4.2. Βιολογικός χαρακτηρισμός των 50 απομονώσεων του ιού της τριστεζας.....	93
3.5. Συζήτηση.....	105
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΤΕΖΑΣ ΤΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ <i>IN VITRO</i>.....	108
4.1. Περίληψη.....	108
4.2. Εισαγωγή.....	109
4.3. Υλικά και Μέθοδοι.....	111
4.3.1. Μητρικά δενδρύλλια προσβεβλημένα με τον ιό της τριστεζας.....	111

4.3.2. Μικροεμβολιασμός <i>in vitro</i> για διάγνωση CTV.....	112
4.3.3. Μελέτη της επίδρασης θρεπτικών υποστρωμάτων στην ανάπτυξη των μικροφυτών μεξικανικής λιμεττίας <i>in vitro</i> προσβεβλημένης με CTV.....	113
4.3.4. Βιολογικός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεζας <i>in vitro</i>	114
4.4. Αποτελέσματα.....	116
4.4.1. Μητρικά δειγματοληψία προσβεβλημένα με τον ιό της τριστεζας.....	116
4.4.2. Μικροεμβολιασμός <i>in vitro</i> για διάγνωση CTV.....	116
4.4.3. Μελέτη της επίδρασης θρεπτικών υποστρωμάτων στην ανάπτυξη των μικροφυτών μεξικανικής λιμεττίας <i>in vitro</i> προσβεβλημένης με CTV.....	117
4.4.4. Βιολογικός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεζας <i>in vitro</i>	119
4.5. Συζήτηση.....	124

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

ΚΥΠΡΙΑΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΤΕΖΑΣ ΤΩΝ

ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ.....	127
51. Περίληψη.....	127
5.2. Εισαγωγή.....	128
5.3. Υλικά και Μέθοδοι.....	129
5.3.1. Αντιδραστήρια.....	129
5.3.2. Δειγματοληψίες από εσπεριδοειδή προσβεβλημένα με CTV.....	130
5.4. Αποτελέσματα.....	133
5.5. Ενίσχυση με RT-PCR του γονιδίου CP και προσδιορισμός των νουκλεοτιδιακών αλληλουχιών του γονιδίου CP.....	133
5.6. Συζήτηση.....	138

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΑΥΡΟΕΙΔΟΥΣ

ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΥΠΡΙΑΚΩΝ ΗΠΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΤΕΖΑΣ ΤΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ.....

6.1. Περίληψη.....	141
--------------------	-----

6.2. Εισαγωγή.....	142
6.3. Υλικά και Μέθοδοι.....	144
6.4. Αποτελέσματα.....	146
6.5. Συζήτηση.....	148

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ
ΕΣΠΕΡΙΑΘΕΙΔΩΝ.....**

7.1. Περίληψη.....	151
7.2. Εισαγωγή.....	152
7.3. Υλικά και Μέθοδοι.....	156
7.3.1. Μητρικά δενδρύλλια για εξυγίανση.....	156
7.3.2. Ιολογικός έλεγχος.....	156
7.3.3. Μικροεμβολιασμός ή μεριστωματικός εμβολιασμός <i>in vitro</i>	157
7.3.4. Χημειοθεραπεία <i>in vitro</i>	159
7.3.5. Θερμοθεραπεία.....	159
7.3.6. Θερμοθεραπεία <i>in vitro</i>	160
7.3.7. Θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών <i>in vitro</i>	160
7.3.8. Μεταφύτευση ή επανεμβολιασμός των μικροεμβολιασμένων φυτών σε υγιή σπορόφυτα κитρομηλιάς (<i>in vivo</i>).....	162
7.4. Αποτελέσματα.....	162
7.4.1. Μητρικά δενδρύλλια για εξυγίανση.....	162
7.4.2. Ιολογικός έλεγχος.....	162
7.4.3. Μικροεμβολιασμός ή μεριστωματικός εμβολιασμός <i>in vitro</i>	163
7.4.4. Χημειοθεραπεία <i>in vitro</i>	163
7.4.5. Θερμοθεραπεία.....	166
7.4.6. Θερμοθεραπεία <i>in vitro</i>	166
7.4.7. Θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών <i>in vitro</i>	167
7.5. Συζήτηση.....	172

ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	175
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	186
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.	
ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ	206
1. Βιολογική ανίχνευση του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών <i>in vitro</i>	206
2. Βιολογικός διαχωρισμός σοβαρών και ήπιων φυλών του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών <i>in vitro</i>	208
3. Εξυγίανση ιοειδών εσπεριδοειδών με θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιων <i>in vitro</i> και μικροεμβολιασμό.....	209
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 . Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του ιού της τριστεζας	212
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3.	224
3.1.Δημοσιεύσεις.....	224
3.2.Εργασίες που παρουσιάστηκαν σε συνέδρια.....	224
3.3.Διαλέξεις-Ενημερωτικά δελτία ΙΓΕ-Περιοδικά.....	225

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

A/A	Τίτλος	Σελ.
1.1	Υποσχόμενα Υποκείμενα για αντικατάσταση της κίτρομηλιάς	38
1.2	Οι κυριότερες ιολογικές και συναφείς ασθένειες των εσπεριδοειδών και τα παθογόνα που τις προκαλούν	39
2.1	Θρεπτικά υποστρώματα για φύτευση μικρομοσχευμάτων εσπεριδοειδών <i>in vitro</i> (pH 5,7)	63
2.2	Χημικά υλικά, αντιδραστήρια, πλαστικά, αναλώσιμα και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες των πειραμάτων των ορολογικών δοκιμών	67
2.3	Χημικά υλικά, αντιδραστήρια μοριακής βιολογίας, πλαστικά αναλώσιμα και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες των πειραμάτων.	69
2.4	Κατάλογος εργαστηριακών συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ιστοκαλλιέργειας, θερμοθεραπείας και μικροεμβολιασμού	80
2.5	Θρεπτικά υποστρώματα για φύτευση σπόρων και μικροεμβολιασμένων φυτών εσπεριδοειδών <i>in vitro</i> (pH 5,7)	81
3.1	Συμπτώματα που εμφανίζονται στα φυτά δείκτες που χρησιμοποιούνται για βιολογικό χαρακτηρισμό του ιού της τριστέζας	86
3.2	Κατηγορίες απομονώσεων του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών με βιολογικό χαρακτηρισμό (Lee <i>et al.</i> 1994)	88
3.3	Κατηγορίες απομονώσεων του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών με βιολογικό χαρακτηρισμό (Garnsey <i>et al.</i> , 2005)	88
3.4	Γεωγραφική προέλευση, ξενιστές και έτος συλλογής των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	92
3.5	Συμπτώματα στα φυτά δείκτες 2 μήνες μετά την μόλυνση	94
3.6	Συμπτώματα στα φυτά δείκτες 6 μήνες μετά την μόλυνση	95
3.7	Συμπτώματα στα φυτά δείκτες 12 μήνες μετά την μόλυνση	96
3.8	Συμπτώματα στα φυτά δείκτες 24 μήνες μετά την μόλυνση	97
3.9	Συμπτώματα στα φυτά δείκτες που παρουσιάστηκαν συνολικά	100
3.10	Ένταση Συμπτωμάτων στα φυτά δείκτες	101

3.11	Μέσοι όροι Ορολογικής αντίδρασης των απομονώσεων 24 μήνες μετά την μόλυνση	102
3.12	Συνολικά συμπτώματα που παρουσίασαν οι απομονώσεις στις διάφορες φυλογενετικές ομάδες	103
3.13	Αριθμός και ποσοστό % απομονώσεων για τις διάφορες κατηγορίες φυλών	103
3.14	Κατάταξη των απομονώσεων τριστέζας σε φυλές	104
4.1	Σύσταση των υποστρωμάτων στα οποία φυτεύτηκαν οι βλαστοί της Μεξικανικής λιμεττίας <i>in vitro</i> .	115
5.1	Περιοχές από τις οποίες έγινε η συλλογή των απομονώσεων CTV μελετήθηκαν	130
5.2	Κωδικοί νουκλεοτιδιακών αλληλουχιών από δημοσιευμένα στελέχη του ιού CTV που καταγράφηκαν σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές και ξενιστές που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογενετική ανάλυση	132
7.1	Είδη και ποικιλίες εσπεριδοειδών που επιλέγηκαν για εξυγίανση	168
7.2	Ιολογικός έλεγχος των ειδών και ποικιλιών εσπεριδοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για εξυγίανση	169
7.3	Επίδραση θερμοθεραπείας <i>in vitro</i> στην επιβίωση και εξυγίανση μικροφύτων ML προσβεβλημένων με 3 απομονώσεις του ιού της τριστέζας	169
7.4	Επιτυχία μικροεμβολιασμού των ειδών και ποικιλιών εσπεριδοειδών με χρήση μεριστώματων από δικτυοκηπίο	170
7.5	Επίδραση ριμπαβιρίνης στην επιβίωση και εξυγίανση μικροφύτων ML προσβεβλημένων με 3 απομονώσεις του ιού της τριστέζας	171

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

A/A	Τίτλος	Σελ.
1.1	Ηλεκτρονική μικρογραφία ιοσωματίων του ιού της τριστέζας	24
1.2	Αφίδα <i>Aphis gossypii</i>	25
1.3	Αφίδα <i>Toxoptera citricida</i>	26
1.4	Χάρτης που δείχνει την διάδοση της αφίδας <i>Toxoptera citricida</i> στις διάφορες χώρες.	27
1.5	Σοβαρή παρακμή και βοθρίωση μετά από προσβολή με τον ιό της τριστέζας σε υποκείμενο <i>Citrus macrophylla</i> , Φασούρι	28
1.6.	Χλώρωση, μαρασμός, ξήρανση κλάδων, μικροκαρπία και παρακμή σε πορτοκαλιά Βαλέντσια προσβεβλημένη με τριστέζα	29
1.7.	Βοθρίωση του ξύλου στο σημείο ένωσης εμβολίου- υποκειμένου	29
1.8	Πολυμικροκαρπία. Παρατηρείται η έκπτυξη πολλών μικρών καρπών από τον ίδιο κλαδίσκο	30
1.9	Γεωγραφική εξάπλωση του ιού της τριστέζας στην Κύπρο	32
1.10	Ηλεκτρονική μικρογραφία ιοσωματίου CPsV	44
1.11	Απολέπιση του φλοιού του κορμού που προκλήθηκε από τον ιό της ψώρωσης	45
1.12	Χλωρώσεις σε σχήμα φύλλου δρυός που προκλήθηκε από τον ιό της ψώρωσης	45
1.13	Παραμόρφωση και ποικιλόχρωση φύλλων που προκλήθηκε από τον ιό της Μολυσματικής Ποικιλόχρωσης.	46
1.14	Συμπτώματα Λιθίασης σε Βοτρυοκάρπο και Βαλέντσια	46
1.15	Συστροφή φύλλων σε κιτριά προσβεβλημένη με ιοειδή	48
1.16	Μαντόρα εμβολιασμένη σε υποκείμενο Troyer στο οποίο παρατηρούνται σχισμές στο φλοιό που προκλήθηκαν από προσβολή με εξωκόρτη	49
1.17	Μαντόρα εμβολιασμένη σε υποκείμενο Troyer στο οποίο παρατηρούνται σχισμές στο φλοιό που προκλήθηκαν από προσβολή με εξωκόρτη	49
1.18	Διάδοση της ασθένειας του πρασινίσματος	50
1.19	Χλώρωση σε φύλλα προσβεβλημένα με την ασθένεια του Greening	51

1.20	Χλώρωση σε φύλλα προσβεβλημένα με την ασθένεια του Greening, συμπτώματα σε φρούτα και το έντομο φορέας	52
1.21	Αφρικανική ψύλλα των εσπεριδοειδών	53
1.22	Ασιατική ψύλλα των εσπεριδοειδών	53
1.23	Συμπτώματα από τον <i>Citrus sudden death-associated virus</i> που εμφανίζονται κάτω από το φλοιό του κορμού	54
1.24	Καταστροφή δένδρων από τον <i>Citrus sudden death-associated virus</i>	54
1.25	Συμπτώματα που προκαλεί η ασθένεια του θανατικού σε φρούτα, φύλλα και δένδρα	55
1.26	Δενδρύλλια εσπεριδοειδών σε γλάστρες στο δικτυοκήπιο (Προβασική Φυτεία Εσπεριδοειδών)	57
2.1	Διαφάνεια των νευρώσεων των φύλλων	59
2.2	Ελαφρά συστροφή της άνω επιφάνειας του ελάσματος των φύλλων	60
2.3	Νανισμός	60
2.4	Βοθρίωση του ξύλου	61
2.5	Μικροεμβολιασμός φλοιού σε μόσχευμα κιτριάς	62
2.6	Εργαστηριακός έλεγχος με την μέθοδο ELISA (Με πράσινο χρώμα εικονίζονται οι υποδοχές της πλακέτας που περιέχουν χυμό από τα προς εξέταση δένδρα)	66
2.7	Εργαστηριακός έλεγχος με την μέθοδο ELISA (Με κίτρινο χρώμα εικονίζονται στην πλακέτα τα δείγματα που είναι προσβεβλημένα με τον ιό της τριστέζας)	66
2.8	Θάλαμος σταθεράς θερμοκρασίας και φωτισμού για επώαση φυτών που αναπτύσσονται <i>in vitro</i>	76
2.9	Ασηπτικός θάλαμος για καλλιέργεια φυτών <i>in vitro</i>	77
2.10	Μικροεμβολιασμός εσπεριδοειδών κάτω από στερεομικροσκόπιο	78
2.11	(α) Μετεμβολιασμός μικρόφυτου σε άλλο ανεπτυγμένο υγιές σπορόφυτο και (β) φύτευση ανεπτυγμένου μικροφυτού του σε χώμα	79
3.1	Συμπτώματα ίκτερου (seedlings yellow) σε κιτρομηλιά	87
4.1	Μικροεμβολιασμός μοσχεύματος μεξικανικής λιμεττίας με φλοιό	113

	μολυσμένο με τον ιό της τριστέζας εσπεριδοειδών <i>in vitro</i> .	
4.2	Διαφάνεια νευρώσεων και καρούλιασμα φύλλων σε μικρόφυτα της απομονώσης CYARI 5 του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών σε καλλιέργεια <i>in vitro</i>	117
4.3	Διαφάνεια νευρώσεων και καρούλιασμα φύλλων σε μικρόφυτα της απομονώσης CYARI 5 του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών σε καλλιέργεια <i>in vitro</i>	118
4.4	Καλλιέργεια και ανάπτυξη μικροφυτών μεξικανικής λιμεττίας <i>in vitro</i>	118
4.5	Διαφάνεια νευρώσεων και καρούλιασμα σε φύλλο από μικρόφυτο της απομονώσης CYARI 11 του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών σε καλλιέργεια <i>in vitro</i> .	119
4.6	Μικρόφυτο λιμεττίας προσβεβλημένο με την σοβαρή απομόνωση CYARI 5 με συμπτώματα βοθρίωσης	120
4.7	Μικροφυλλία σε μικρόφυτα λιμεττίας προσβεβλημένα με την σοβαρή απομόνωση CYARI 5	121
4.8	Μικροφυλλία σε μικρόφυτα λιμεττίας προσβεβλημένα με την μετρίως σοβαρή απομόνωση CYARI 11 (δεξιά) σε σχέση με τους μάρτυρες (αριστερά).	122
5.1	Περιοχές συλλογής των δειγμάτων από τις τέσσερις επαρχίες της ελεύθερης Κύπρου.	131
5.2	Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της CP των απομονώσεων που μελετήθηκαν	133
5.3	Ποσοστά ομοιότητας και διαφορών σε αριθμό επιλεγμένων (37) νουκλεοτιδιακών αλληλουχιών απομονώσεων του CTV από την Κύπρο.	134
5.4	Φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάστηκε με τη μέθοδο εκτίμησης μητρών απόστασης (Neighbour Joining, NJ) 1000 επαναλήψεων	135
5.5	Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Α που περιλαμβάνει τις ήπιες απομονώσεις που δεν προκαλούν ορατά συμπτώματα σε εσπεριδοειδή στον αγρό	136

5.6	Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Γ που περιλαμβάνει τις ήπιες απομονώσεις που δεν προκαλούν ορατά συμπτώματα σε εσπεριδοειδή στον αγρό	136
5.7	Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Β που περιλαμβάνει τις απομονώσεις μέτριας σοβαρότητας που προκαλούν συμπτώματα βαθμιαίας παρακμής στον αγρό	137
5.8	Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Δ που περιλαμβάνει τις σοβαρές απομονώσεις που προκαλούν συμπτώματα ταχείας παρακμής στον αγρό χωρίς βοθρίωση	137
5.9	Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Ε που περιλαμβάνει τις σοβαρές απομονώσεις που προκαλούν συμπτώματα παρακμής στον αγρό και βοθρίωση σε πορτοκαλιά και γκρέιπφρουτ	138
5.10	Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Ζ που περιλαμβάνει τις σοβαρές απομονώσεις που προκαλούν συμπτώματα ταχείας παρακμής στον αγρό και βοθρίωση σε πορτοκαλιά και γκρέιπφρουτ	138
7.1	Μητρικό δενδρύλλιο Λεμονιάς Λαπήθου και άλλα είδη και ποικιλίες εσπεριδοειδών προς εξυγίανση	157
7.2	Μικροεμβολιασμένα μικρόφυτα εσπεριδοειδών σε θάλαμο σταθεράς θερμοκρασίας	158
7.3	Ανάπτυξη μεριστώματος στο σωλήνα	161
7.4	Ανάπτυξη μικροφύτων που υπέστησαν χημειοθεραπεία <i>in vitro</i>	165
7.5	Μεταφύτευση μικροεμβολιασμένων μικροφύτων εσπεριδοειδών στο χώμα	166
7.6	Ανάπτυξη μικροφύτων που υπέστησαν θερμοθεραπεία <i>in vitro</i>	167

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

A/A	Τίτλος	Σελ.
1.1	Ευπάθεια διαφόρων υποκειμένων στην κορυφοξήρα	38
1.2	Στάδια προγράμματος παραγωγής ελεγμένου πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών στην Κύπρο	56
2.1	Διάγραμμα σταδίων DAS ELISA	65
3.1	Ύψος 50 φυτών δεικτών Navel σε κιτρομηλιά εμβολιασμένων με τις 50 απομονώσεις του ιού της τριστεζας 24 μήνες μετά την μόλυνση	98
3.2	Ύψος 50 φυτών δεικτών κιτρομηλιάς εμβολιασμένων με τις 50 απομονώσεις του ιού της τριστεζας 24 μήνες μετά την μόλυνση	98
3.3	Ύψος 50 φυτών δεικτών γκρέιπφρουτ εμβολιασμένων με τις 50 απομονώσεις του ιού της τριστεζας 24 μήνες μετά την μόλυνση	98
3.4	Ύψος 50 φυτών δεικτών Madam Vinous εμβολιασμένων με τις 50 απομονώσεις του ιού της τριστεζας 24 μήνες μετά την μόλυνση	99
3.5	Ύψος 50 φυτών δεικτών Mexican Lime εμβολιασμένων με τις 50 απομονώσεις του ιού της τριστεζας 24 μήνες μετά την μόλυνση	99
4.1	Επίδραση των 4 απομονώσεων του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών στο μήκος του νέου βλαστού των μικροφυτών ML σε καλλιέργεια <i>in vitro</i>	122
4.2	Επίδραση των 4 απομονώσεων του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών στο βάρος του νέου βλαστού και φύλλων των μικροφυτών ML σε καλλιέργεια <i>in vitro</i>	123
4.3	Επίδραση των 4 απομονώσεων του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών στον αριθμό των φύλλων των μικροφυτών ML σε καλλιέργεια <i>in vitro</i>	123
4.4	Επίδραση των 4 απομονώσεων του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών στην εμφάνιση συμπτωμάτων στα μικροφυτά σε καλλιέργεια <i>in vitro</i>	124

6.1	Πείραμα σταυροειδούς προστασίας δενδρυλλίων Washington navel εμβολιασμένων σε κιτρομηλιά από την σοβαρή απομόνωση του ιού της τριστεζας CYARI 5 με χρήση των ήπιων απομονώσεων CYARI 7 και CYARI 24	145
6.2	Ύψος των δενδρυλλίων Navel/SO σε cm δύο χρόνια μετά την έναρξη των πειραμάτων	147
6.3	Ύψος των νέων βλαστών των δενδρυλλίων Navel/SO σε cm 30 μήνες μετά την εφαρμογή της σταυροειδούς προστασίας	147
6.4	Εμφάνιση συμπτωμάτων βοθρίωσης του ξύλου στα δενδρύλλια Navel/SO	148
7.1	Ακραίο μερίστωμα	154
7.2	Επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών <i>in vitro</i> για εξυγίανση μεριστωμάτων των ιοειδών CEVd και HSVd από βλαστούς λεμονιάς Λαπήθου	171

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CTV	Citrus tristeza virus
CPsV	Citrus psorosis virus
CLRV	Citrus leaf rugose virus
CCLV	Citrus crinkly leaf virus
CVV	Citrus variegation virus
CEVd	Citrus exocortis viroid
HSVd	Hop stunt viroid
CBLVd	<i>Citrus bent leaf viroid</i>
CDVd	<i>Citrus dwarfing viroid</i>
CBCVd	<i>Citrus bark cracking viroid</i>
CLRV	Citrus leaf rugose virus
CRSV	Citrus ringspot virus
SDV	Satsuma dwarf virus
CiMV	Citrus mosaic virus
NDV	Natsudaikai dwarf virus
NiMV	Navel orande infectious mottling virus
CTLV	Citrus Tatter leaf virus
ML	Mexican lime
ΜΛ	Μεξικανική λιμεττία
ΙΓΕ	Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών
ΔΝ	Διαφάνεια νευρώσεων
ΚΦ	Καρούλιασμα φύλλου
ΒΟΘ	Βοθρίωση

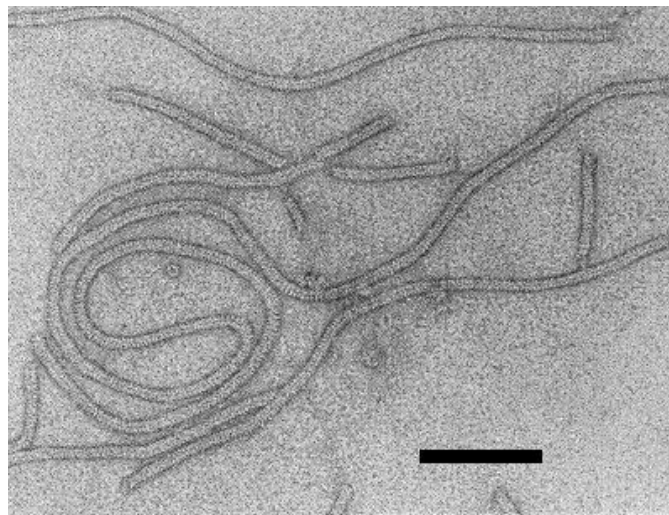
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1. Ο ιός της τριστεζας των εσπεριδοειδών (*Citrus tristeza virus*)

Ο ιός της τριστεζας των εσπεριδοειδών (CTV) προκαλεί την πιο καταστροφική ιολογική ασθένεια των εσπεριδοειδών σε όλο τον κόσμο (Rocha-Pena *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1994). Ξενιστές του ιού είναι όλα τα είδη εσπεριδοειδών και μερικά είδη *Passiflora* (Bar Joseph *et al.*, 1989; Rocha-Pena *et al.*, 1994).

1.1.1. Ιδιότητες του ιού της τριστεζας

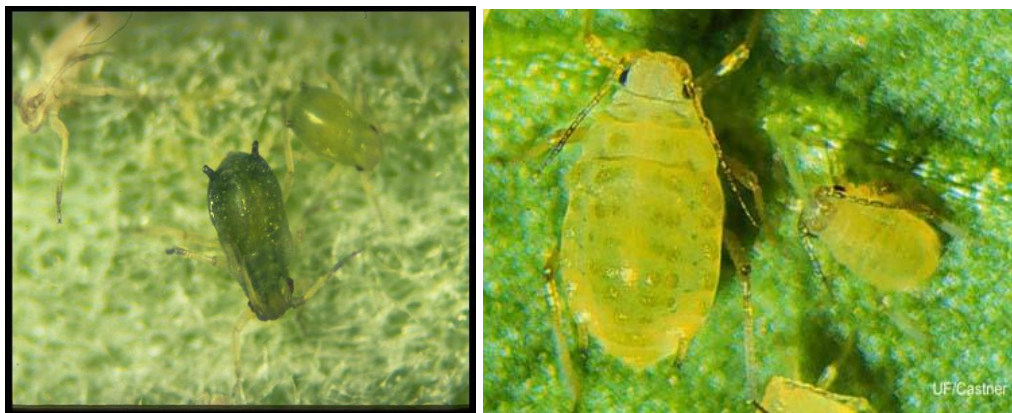
Ο ιός της τριστεζας ανήκει στο γένος *Closterovirus* της οικογένειας *Closteroviridae*. Είναι ο μεγαλύτερος σε μέγεθος φυτικός ιός. Το ισωμάτιο του ιού είναι μια εύκαμπτη ράβδος με μήκος 2000 nm και διάμετρο 10-12 nm (Εικόνα 1.1.). Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από ένα μονόκλωνο (single stranded) μόριο ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) θετικής πολικότητας (positive-sense) με 19256 νουκλεοτίδια το οποίο περιβάλλεται από δύο προστατευτικά καλύμματα πρωτεϊνών 25 και 27 KDa (Garnsey *et al.*, 1998).



Εικόνα 1.1. Ηλεκτρονική μικρογραφία ισωματίων του ιού της τριστεζας (Bar represents 100 nm). <http://www.dpvweb.net>

1.1.2. Μετάδοση του ιού της τριστέζας

Ο ιός μεταδίδεται με μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό (εμβόλια) και με διάφορα είδη αφίδων (Rocha-Reña *et al.*, 1995). Η μετάδοση του ιού με τις αφίδες γίνεται κατά ημιέμμονο τρόπο. Η αφίδα, αφού τραφεί σε ένα δένδρο που είναι μολυσμένο με τριστέζα, φέρει τον ιό και μπορεί να τον μεταδώσει για 24-48 ώρες. Ο ιός δεν πολλαπλασιάζεται μέσα στο έντομο και έτσι η αφίδα χάνει την ικανότητα μετάδοσης του ιού. Η αφίδα *Aphis gossypii* (Εικόνα 1.2), που είναι ο φορέας της τριστέζας στην Κύπρο και σε όλο τον Μεσογειακό χώρο, δεν είναι πολύ αποτελεσματική (Calavan *et al.*, 1989; Gottwald *et al.*, 1995). Άλλα είδη αφίδων που θεωρούνται φορείς του ιού της τριστέζας αλλά δεν την μεταδίδουν αποτελεσματικά, είναι: *Aphis spiraecola*, *Toxoptera aurantii*, *Myzus persicae*, *Dactynotus jaceae*, και *Aphis craccivora* (Rocha-Reña *et al.*, 1995).



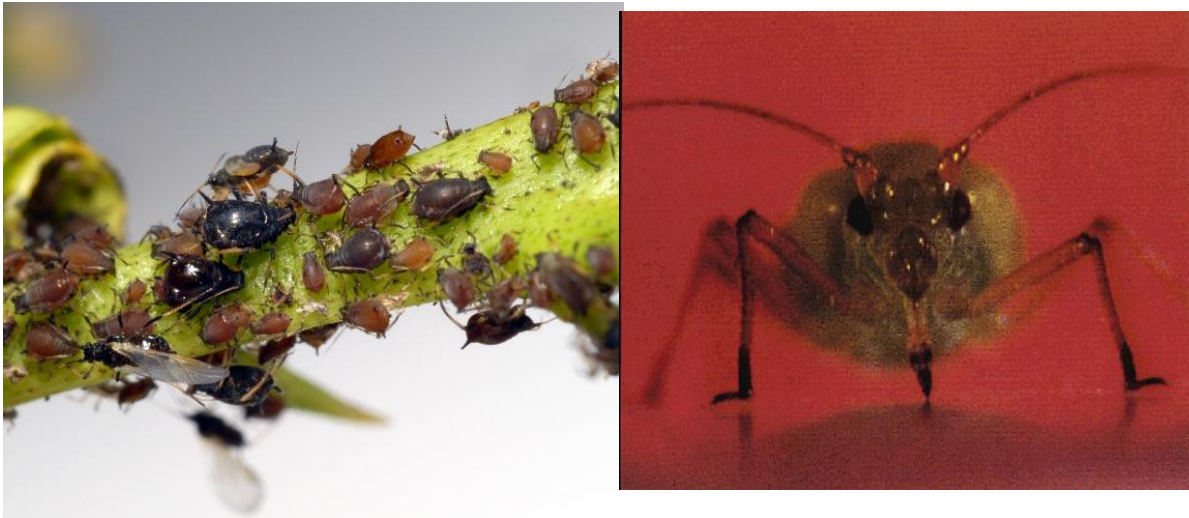
Εικόνα 1.2 . Αφίδα *Aphis gossypii*

(<http://nfrec.ifas.ufl.edu/MizellRF/WoodyBug/197.htm>)

Ο πιο αποτελεσματικός φορέας του ιού είναι η αφίδα *Toxoptera citricida*, που μεταδίδει κυρίως σοβαρά στελέχη του ιού (Εικόνα 1.3). Πιστεύεται ότι το είδος αυτό κατάγεται από την Ασία. Από το πρώτο μισό του εικοστού αιώνα, η αφίδα έχει διαδοθεί ευρέως στα εσπεριδοειδή στην Ασία, την Ινδία, τη Νέα Ζηλανδία, την Αυστραλία (Broadbent *et al.*, 1996), σε νησιά του Ειρηνικού (συμπεριλαμβανομένης της Χαβάης), την Αφρική νότια της Σαχάρας, την Μαδαγασκάρη, τα Νησιά του Ινδικού Ωκεανού και τη Νότια Αμερική. Η διάδοση αυτή οφείλεται στην διακίνηση της με μολυσμένα φύλλα ή πολλαπλασιαστικό

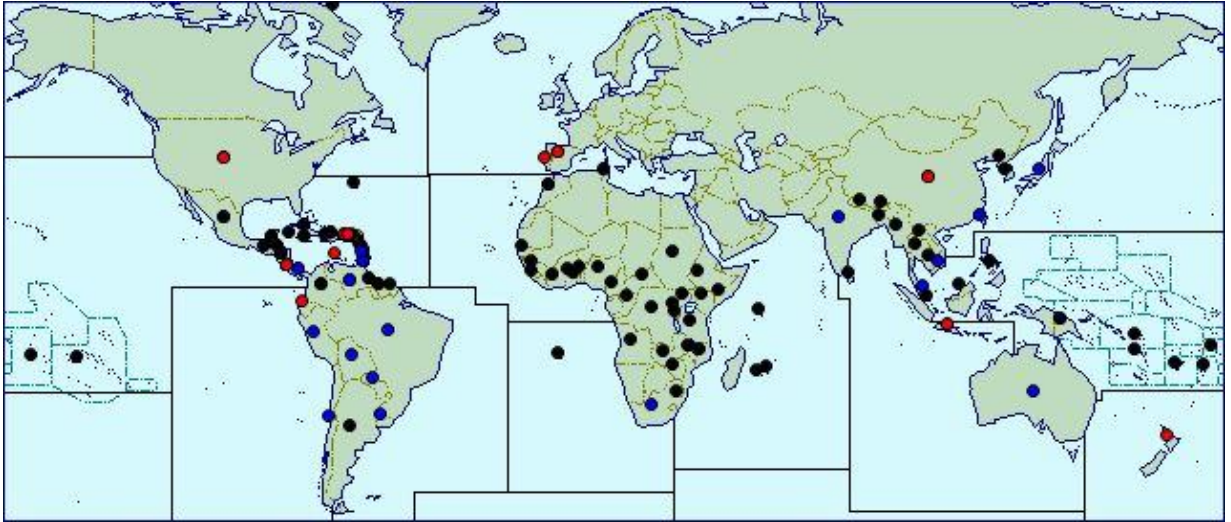
υλικό. Σε περίπτωση που η αφίδα εισέλθει σε μια περιοχή οι πληθυσμοί αυξάνονται ραγδαία και η αντιμετώπιση της είναι πολύ δύσκολη (Garnsey *et al.*, 1998).

Έτσι σήμερα η αφίδα αυτή είναι διαδεδομένη σχεδόν σε όλο τον κόσμο (Εικόνα 1.4) με εξαίρεση την περιοχή της Μεσογείου και μέρος των ΗΠΑ (EPPO, 2014; Gottwald T.R., 2009; Garnsey *et al.*, 1998; Sieburth and Nolan 2005), εκτός της Φλώριδας όπου εμφανίστηκε το 1995 (Halberd and Brown, 1996). Γίνεται αναφορά και για εμφάνιση της αφίδας στο Μεξικό (Michaud and Alvarez, 2000). Αναφορά γίνεται το 2014 και για ύπαρξη του εντόμου στην Ισπανία (D'Onghia, 2009), γεγονός που καθιστά πολύ επικίνδυνη την διάδοση του εντόμου και σε άλλες χώρες της Μεσογείου όπως η Κύπρος.



Εικόνα 1.3. Αφίδα *Toxoptera citricida*

(<http://entnemdept.ufl.edu/insectid/images/brown-citrus-aphids-Toxoptera-citricida-Buss.jpg>)



Εικόνα 1.4. Χάρτης που δείχνει την διάδοση της αφίδας *Toxoptera citricida* στις διάφορες χώρες. Με κύκλους μαύρου χρώματος φαίνονται οι περιοχές όπου υπάρχει η αφίδα. Με κύκλους γαλάζιου χρώματος φαίνονται οι περιοχές όπου η αφίδα είναι ευρέως διαδεδομένη και με κύκλους κόκκινου χρώματος φαίνονται οι περιοχές όπου η αφίδα εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές.

(<http://www.cabi.org/isc/datasheet/54271#20127201272>)

1.1.3. Ασθένειες που προκαλεί ο ιός της τριστεζας

Ο ιός προκαλεί τρεις ασθένειες ή σύνδρομα στα προσβεβλημένα δένδρα.

Α. Παρακμή (Quick decline) σε ορισμένα είδη εσπεριδοειδών, όπως πορτοκαλιά (*Citrus sinensis*) και μανταρινιά (*Citrus reticulata*) εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά/νεραντζιά (*Citrus aurantium*).

Β. Βοθρίωση του ξύλου (stem pitting) σε δένδρα γκρέϊπφρουτ (*Citrus paradisi*), πόμελο, πορτοκαλιάς κ.ά. που συνδέεται με σοβαρή παρακμή του δένδρου (Εικόνα 1.5). Θεωρείται η πιο σοβαρή ασθένεια της τριστεζας και μεταδίδεται πολύ αποτελεσματικά με την αφίδα *Toxoptera citricida*.

Γ. Ίκτερος των σποροφύτων (seedlings yellows) σε δενδρύλλια κιτρομηλιάς, λεμονιάς (*Citrus limon*) και γκρέϊπφρουτ στο θερμοκήπιο (Lee *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 2011; Rocha Pena *et al.*, 1998; Sagheer *et al.*, 2012).



Εικόνα 1.5. Σοβαρή παρακμή και βοθρίωση μετά από προσβολή με τον ιό της τριστεύζας σε υποκείμενο *Citrus macrophylla*, Φασούρι.

1.1.4. Συμπτώματα

Τα προσβεβλημένα δένδρα παρουσιάζουν διάφορα συμπτώματα που σε μερικές περιπτώσεις είναι ήπια και δεν μειώνουν την παραγωγική ικανότητα του δένδρου, ενώ σε άλλες περιπτώσεις είναι πολύ σοβαρά. Ένα από τα σοβαρότερα συμπτώματα που προκαλεί η τριστεύζα είναι η αποπληξία που εκδηλώνεται με απότομο μαρασμό και νέκρωση της κόμης σε νεαρά δένδρα εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά. Σε δένδρα μεγαλύτερης ηλικίας παρατηρείται βαθμιαία ξήρανση, περιορισμένη και καχεκτική βλάστηση, χλωρωτικό φύλλωμα, φυλλόπτωση, νανισμός, εύθραυστοι κλαδίσκοι, αποξήρανση κλαδίσκων και μεγαλύτερων κλάδων, μικροκαρπία, παρακμή (Εικόνα 1.6), νέκρωση της βίβλου στο υποκείμενο, βοθρίωση του ξύλου (Εικόνα 1.5, 1.10) και τελικά συνολική αποξήρανση του δένδρου (Καπαρή-Ησαΐα κ.α., 2005).

Η νέκρωση της βίβλου που εμφανίζεται κάτω από το σημείο εμβολιασμού, παρεμποδίζει ή δυσχεραίνει την μεταφορά των υδατανθράκων από την κόμη του δένδρου προς τις ρίζες. Σαν αποτέλεσμα, το ριζικό σύστημα του προσβεβλημένου δένδρου αρχίζει να καταστρέφεται και παράλληλα αρχίζει και η παρακμή του δένδρου (Bar-Joseph *et al.*, 1981; Wallace, 1978).



Εικόνα 1.6. Χλώρωση, μαρασμός, ξήρανση κλάδων, μικροκαρπία και παρακμή σε πορτοκαλιά Βαλέντσια προσβεβλημένη με τριστέζα.



Εικόνα. 1.7. Βοθρίωση του ξύλου στο σημείο ένωσης εμβολίου- υποκειμένου.

Σε αρκετά δένδρα προσβεβλημένα με τριστέζα εμφανίζεται και το σύμπτωμα της πολυμικροκαρπίας δηλαδή παραγωγής μεγάλου αριθμού μικρών καρπών κακής ποιότητας από τον ίδιο κλαδίσκο (Εικόνα 1.8) (Καπαρή-Ησαΐα κ.α., 2005).



Εικόνα.1.8. Πολυμικροκαρπία. Παρατηρείται η έκπτυξη πολλών μικρών καρπών από τον ίδιο κλαδίσκο.

Τα συμπτώματα μπορεί να εκδηλωθούν μετά από παρέλευση αρκετών χρόνων ειδικά σε περιπτώσεις προσβολής με ήπια φυλή του ιού, οπότε η παραγωγική ζωή του δένδρου είναι αρκετά μεγάλη και κυμαίνεται από 15 μέχρι 20 χρόνια. Σε πολλές περιπτώσεις, τα προσβεβλημένα δένδρα είναι ασυμπτωματικοί φορείς της ασθένειας και αποτελούν εστίες μόλυνσης που μπορούν να μολύνουν άλλα πιο ευπαθή δένδρα (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1994). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μόλυνση από ήπια φυλή του ιού, σε ανεκτικότητα της ποικιλίας, στο στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται η ίωση, ή στις συνθήκες του περιβάλλοντος (Κυριακοπούλου, 1993).

Η εκδήλωση και η σοβαρότητα των συμπτωμάτων της ασθένειας εξαρτώνται από το είδος του δένδρου, από τον συνδυασμό εμβολίου-υποκειμένου και από την φυλή του ιού. Ακόμα, εξαρτώνται από την ποσότητα του αρχικού μολύσματος, τον τρόπο μόλυνσης, την ηλικία και την κατάσταση του δένδρου κατά την μόλυνση και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Κυριακοπούλου, 1993).

1.1.5. Φυλές ή στελέχη του ιού

Προέρχονται από μεταλλάξεις που υφίσταται το γονιδίωμα του ιού, οι οποίες είναι απότομες αλλαγές στο RNA, μετά από επίδραση από αλλαγές θερμοκρασιών, επιμόλυνση νέων ξενιστών και μετάδοση από αφίδες (Folimonova, 2013; Κυριακοπούλου, 1999).

Η σταθερότητα της φυλής εξαρτάται από την περιπλοκότητα των γενετικών πληροφοριών και την πιστότητα κατά την αναπαραγωγή του γονιδιώματος του ιού.

Οι φυλές ή στελέχη του ιού παρουσιάζουν διαφορές στις βιολογικές (είδος και ένταση συμπτωμάτων), στις ορολογικές και μοριακές τους ιδιότητες. Ο χαρακτηρισμός των φυλών είναι σημαντικός για την επιδημιολογία και αντιμετώπιση της ασθένειας (Κυριακοπούλου, 1993; Κυριακοπούλου, 1999).

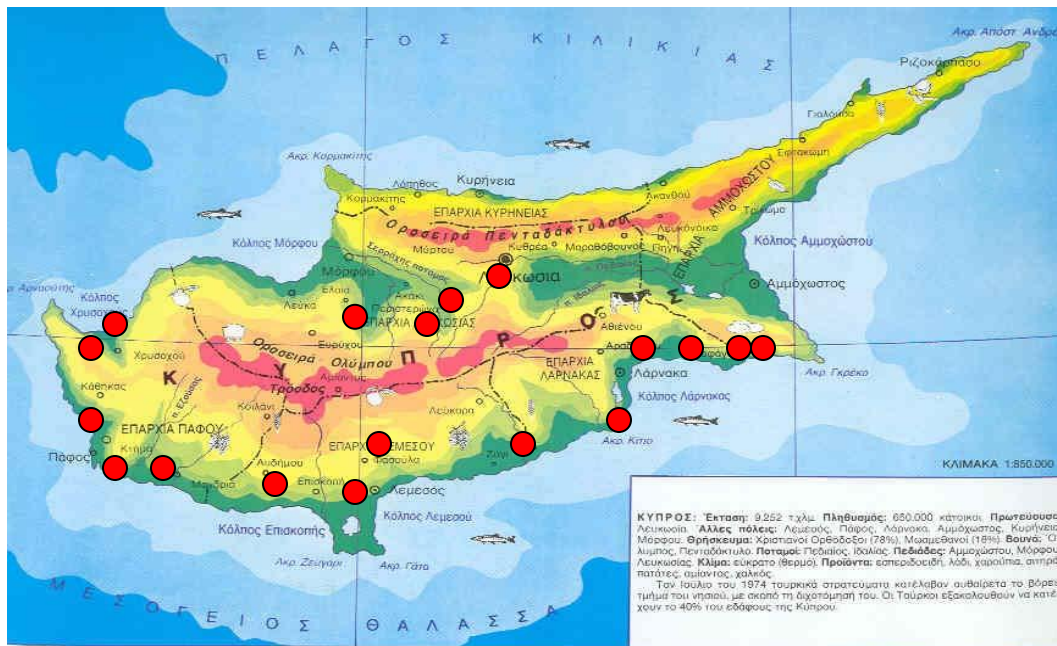
1.2. Η τριστέζα των εσπεριδοειδών στην Κύπρο

1.2.1. Εισαγωγή του ιού της τριστέζας στην Κύπρο

Στην Κύπρο ο ιός της τριστέζας εισήχθηκε με μολυσμένα εμβόλια από τη Νότιο Αφρική το 1929 και ανιχνεύτηκε το 1966 σε 27 δένδρα στο φυτώριο Αμμοχώστου (Papasolomontos and Economides, 1968). Τα δένδρα αυτά καταστράφηκαν και για δύο δεκαετίες επικράτησε η εντύπωση ότι η τριστέζα είχε εξαλειφθεί. Μετά όμως από περιορισμένη επισκόπηση που έγινε το 1986 από το Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών στα πλαίσια ενός ευρύτερου προγράμματος για παραγωγή ελεγμένου πολλαπλασιαστικού υλικού των εσπεριδοειδών (απαλλαγμένου από συγκεκριμένους ιούς και συναφή παθογόνα), εντοπίστηκε τριστέζα σε 4 φυτείες στην επαρχία Αμμοχώστου και Λάρνακας (Kyriakou and Polycarpou, 1989; Kyriakou *et al.*, 1993; Kyriakou *et al.*, 1996).

Από το 1992 άρχισε συστηματική επισκόπηση όλων των εσπεριδοειδών της Κύπρου (Εικόνα 1.9), με κύριο στόχο τον εντοπισμό και καταστροφή των προσβεβλημένων με τριστέζα δένδρων ή και φυτειών, όπου ήταν δυνατό, ούτως ώστε να παρεμποδιστεί η

εξάπλωση της ασθένειας (Kyriakou *et al.*, 1993; Karari *et al.*, 2000; Kyriakou *et al.*, 2002; Kyriakou *et al.*, 2006; Kyriakou *et al.*, 2009). Η επισκόπηση αποτελούσε μέρος ενός ευρύτερου Σχεδίου για την αντιμετώπιση του ιού της τριστεζας στην Κύπρο που περιλαμβάνει παράλληλα και την παραγωγή και διάδοση ελεγμένου (virus tested) πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών (Kyriakou *et al.*, 2002, Karari-Isaia and Kyriakou, 2003; Karari-Isaia *et al.*, 2001; Karari-Isaia *et al.*, 2014).



Εικόνα 1.9. Γεωγραφική εξάπλωση του ιού της τριστεζας στην Κύπρο (Με κόκκινο κύκλο σημειώνονται οι περιοχές όπου βρέθηκαν φυτείες προσβεβλημένες με τριστεζα).

1.2.2. Σχέδιο για αντιμετώπιση του ιού της τριστεζας στην Κύπρο (1992-2006)

Για την άμεση αντιμετώπιση του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών τέθηκε σε εφαρμογή το 1992 ειδικό δεκαπενταετές Σχέδιο από το Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών και το Τμήμα Γεωργίας στα πρότυπα παρόμοιων Σχεδίων που εφαρμόζονται και σε άλλες χώρες παραγωγής εσπεριδοειδών, όπως η Ισπανία, το Ισραήλ, οι ΗΠΑ, η Νότιος Αφρική κ.ά. (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Bar-Joseph *et al.* 2002; Broembsen and Lee, 1988; Dodds, 1994; Gottwald, 1995; Gottwald *et al.*, 2002; Hughes and Gottwald, 1998; Yokomi, 1995).

Το Υπουργικό Συμβούλιο της Κύπρου με Απόφαση του με αριθμό 34.936 και ημερομηνία 31/1/91 ενέκρινε Σχέδιο πενταετούς διάρκειας για Αντιμετώπιση του Ιού της τριστέζας στα Εσπεριδοειδή συνολικού ύψους Κ£ 271 350. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή του Σχεδίου κατά τα δύο πρώτα χρόνια, καταρτίστηκε τριετές Συμπληρωματικό Σχέδιο, ύψους Κ£ 170 000, που εγκρίθηκε με απόφαση του Υπουργικού Συμβουλίου με αριθμό 41.152 και ημερ. 1/6/1994 και τέθηκε σε εφαρμογή από την 1/1/1995. Με το τέλος των δύο πιο πάνω Σχεδίων, αυτά ενοποιήθηκαν και το ενοποιημένο Σχέδιο ανανεώθηκε για περίοδο πέντε ακόμα ετών, από 1/1/1997 μέχρι 31/12/2001, με απόφαση του Υπουργικού Συμβουλίου με αριθμό 44.777 και ημερ. 4/9/1996. Το ανανεωμένο Σχέδιο ήταν ύψους Κ£ 638 500. Το Σχέδιο ανανεώθηκε ξανά για περίοδο πέντε ακόμα ετών, δηλ από 1.1.2002 μέχρι 31.12.2006, με απόφαση του Υπ. Συμβουλίου 53.574 ημερ. 25/4/2001.

Η ανανέωση του Σχεδίου για ακόμη μια πενταετία (2010-2015), κρίθηκε αναγκαία για την αποφυγή της περαιτέρω διάδοσης του ιού στις καλλιέργειες εσπεριδοειδών της Κύπρου, καθώς και για την επιτυχή αντιμετώπιση της απειλής που δημιουργείται με την εισαγωγή πιο σοβαρών στελεχών και πιο αποτελεσματικών φορέων του ιού. Η αφίδα *Toxoptera citricida*, που θεωρείται ο σημαντικότερος φορέας για τη μετάδοση της ασθένειας, έχει πρόσφατα αποικίσει τα εσπεριδοειδή στην Πορτογαλία και την Ισπανία (D'Onchia *et al.*, 2009), ενώ υπάρχει μεγάλος κίνδυνος για τη διάδοση της σε ολόκληρη τη Μεσογειακή λεκάνη. Η είσοδος της Κύπρου στην Ευρωπαϊκή Ένωση και η φιλελευθεροποίηση της διακίνησης φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού αυξάνει το ενδεχόμενο εισαγωγής, τόσο της αφίδας, όσο και των πιο καταστροφικών μορφών του ιού. Δυστυχώς το Υπουργικό Συμβούλιο δεν ενέκρινε την παράταση του Σχεδίου λόγω του τερματισμού των νέων προσλήψεων και έτσι από το 2012 το Σχέδιο υπολειτουργεί λόγω έλλειψης Προσωπικού.

Το Σχέδιο αυτό είχε σαν κύριους στόχους:

- i) τη συστηματική επισκόπηση των εσπεριδοειδών του τόπου για επισήμανση των προσβεβλημένων δένδρων,

- ii) την καταστροφή των προσβεβλημένων δένδρων και φυτειών ώστε να παρεμποδιστεί η εξάπλωση της ασθένειας, και
- iii) τη χρήση ελεγμένου και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού για την εγκατάσταση νέων φυτειών και για τον επανεμβολιασμό παλαιότερων φυτειών (Kyriakou *et al.*, 2002; Καπαρή-Ησαΐα *κ.α.*, 2005).

1.2.3. Επισκόπηση των εσπεριδοειδών για εντοπισμό του ιού της τριστέζας στην Κύπρο και Εργαστηριακός έλεγχος

Η επισκόπηση των εσπεριδοειδών άρχισε από την επαρχία Αμμοχώστου επειδή εκεί εντοπίστηκε για πρώτη φορά ο ιός της τριστέζας και οι περισσότερες φυτείες φαίνονταν προβληματικές. Ακολούθησε επισκόπηση σε περιοχές της Λευκωσίας και σε άλλες φυτείες από διάφορες περιοχές της Κύπρου που φάνηκε από την πορεία της έρευνας ότι ήταν οι πηγές προέλευσης του μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Παράλληλα, η επισκόπηση γινόταν σε όλες τις φυτείες μιας περιοχής ώστε να καλύψει μια γεωγραφική περιοχή καθώς και σε φυτείες που ήταν προβληματικές.

Με την εφαρμογή του Σχεδίου της Αναδιάρθρωσης των Εσπεριδοειδών (2000 – 2004) κατά το οποίο παλιές φυτείες κατατομούνταν με στόχο την αλλαγή ποικιλίας με επανεμβολιασμό, ελέγχονταν κατά προτεραιότητα οι φυτείες αυτές ώστε να επανεμβολιάζονται μόνο όσες ήταν απαλλαγμένες από τριστέζα.

Στα πλαίσια της επισκόπησης γινόταν αρχικά χαρτογράφηση της φυτείας και συμπλήρωση ερωτηματολογίου που περιλάμβανε πληροφορίες αναφορικά με τα στοιχεία του παραγωγού, την τοποθεσία, την έκταση, τις ποικιλίες και αριθμό δένδρων κάθε ποικιλίας, την ηλικία των δένδρων, το υποκείμενο, την προέλευση των εμβολίων, την ύπαρξη συμπτωμάτων και τη γενική κατάσταση της φυτείας. Ακολουθούσε δειγματοληψία σε ποσοστό 10-20% των δένδρων της φυτείας. Κάθε δένδρο χαρακτηριζόταν με κωδικό αριθμό και αποτελούσε ένα δείγμα.

Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν με την βοήθεια ειδικών ορολογικών μεθόδων και κυρίως με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) που παρουσιάζει ψηλή ευαισθησία με δυνατότητες ανίχνευσης μικρών ποσοτήτων ιού. μειονέκτημα Η μέθοδος ELISA που χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για την ανίχνευση του ιού της τριστεζας, παρουσιάζει το της αδυναμίας ανίχνευσης του ιού σε περιόδους με πολύ χαμηλή ή πολύ ψηλή θερμοκρασία (Parayiannis *et al.*, 2002).

Εξάλλου, η μέθοδος αυτή παρέχει την δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων και είναι ταχεία, αφού τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα σε 24-48 ώρες (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Bar-Joseph *et al.*, 1980; Garnsey and Cambra 1991; Κατής κ.ά., 2001; Rocha-Pena and Lee 1991). Χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι της μεθόδου η άμεση (Direct-ELISA) και η έμμεση (Indirect ELISA). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ο έλεγχος γινόταν με χρήση φύλλων του προς εξέταση δένδρου. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη μέθοδος ELISA που αναπτύχθηκε στο Ισραήλ (Bar-Joseph and Hadjinicolis, 1994; Hadjinicolis *et al.*, 1995) κατά την οποία χρησιμοποιούνταν κομματάκια κλαδίσκων για την ανίχνευση του ιού. Δοκιμάστηκε παράλληλα και η μέθοδος Direct Tissue Blot Immunoassay (DTBIA), κατά την οποία η διάγνωση του ιού γίνεται με αποτύπωση φυτικού ιστού σε ειδική μεμβράνη (Garnsey *et al.*, 1993; Cambra *et al.*, 2002).

Σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές (RT-PCR) για την ανίχνευση του ιού (Parayiannis *et al.*, 2007) που είναι πιο ακριβείς και πιο ευαίσθητες από τις ορολογικές αλλά δεν μπορούν να εφαρμοστούν για έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων (Mathews, 1997).

1.2.4. Αποτελέσματα της επισκόπησης για τον ιό της τριστεζας

Οι δειγματοληψίες και ο εργαστηριακός έλεγχος για τον ιό της τριστεζας πραγματοποιούνταν σε περιόδους όπου οι θερμοκρασίες κυμαίνονται από 15-35 °C και ήταν ευνοϊκές για εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Έχουν ελεγχθεί μέχρι τώρα με την ορροδιαγνωστική μέθοδο ELISA 75 000 δένδρα σε όλη την Κύπρο από τα οποία βρέθηκαν ιωμένα τα 4250. Τα δένδρα αυτά προέρχονται από 850 φυτείες με συνολικό αριθμό δένδρων 630 000 που αποτελούν περίπου το 55% των εσπεριδοειδών της Κύπρου. Η επισκόπηση αφορούσε τις 5 επαρχίες της Κύπρου και το ποσοστό προσβολής των δένδρων με τριστέζα ήταν χαμηλό για τις τέσσερις επαρχίες και κυμαινόταν από 1,88 μέχρι 4,74%, ενώ για την επαρχία Αμμόχωστου ήταν ψηλό (17,4%). Ψηλό (72,4%) ήταν και το ποσοστό προσβολής των φυτειών της επαρχίας Αμμοχώστου. Επίσης, ψηλό ποσοστό προσβολής των δένδρων παρουσιάζεται και στην περιοχή Φασουρίου, Λεμεσού.

Τα περισσότερα προσβεβλημένα δένδρα η/και φυτείες έχουν εκριζωθεί. Εξάιρεση αποτελεί η επαρχία Αμμοχώστου, όπου λόγω του ψηλού ποσοστού προσβολής (17,4 % των δένδρων και 72,4% των φυτειών), η εκρίζωση των δένδρων ή/και φυτειών θεωρήθηκε ανέφικτη. Εκριζώθηκε μόνο μια φυτεία που ήταν προσβεβλημένη με σοβαρή μορφή του ιού. Για αντιμετώπιση της ασθένειας στην επαρχία αυτή, μελετάται η χρήση άλλων υποκειμένων ανεκτικών στον ιό της τριστέζας για αντικατάσταση της κιτρομηλιάς που θεωρείται ευπαθής στην τριστέζα (Καπαρή-Ησαία κ.α., 2005; Καπαρή-Ησαία, 2013).

1.3. Υποκείμενα εσπεριδοειδών ανεκτικά στον ιό της τριστέζας

Κύριο υποκείμενο εσπεριδοειδών στην Κύπρο είναι η Κιτρομηλιά (νεραντζιά). Πλεονεκτήματα της κιτρομηλιάς είναι η καλή παραγωγικότητα, η εξαιρετική ποιότητα καρπού, η ικανοποιητική προσαρμογή σε όλα τα εδάφη, η ανεκτικότητα στα άλατα και το ψηλό pH του εδάφους, η ανεκτικότητα σε διάφορα ιοειδή, στη κομμίωση, στο θανατικό (blight) κλπ.

Με στόχο την εξεύρεση υποκειμένων ανεκτικών στην τριστέζα για να αντικαταστήσουν την κιτρομηλιά άρχισε τη δεκαετία του 1960, ειδικό πρόγραμμα στο πειραματικό Σταθμό του ΙΓΕ στη Μόρφου το οποίο όμως διακόπηκε μετά την τουρκική εισβολή και την κατάληψη της Μόρφου το 1974.

Το Πρόγραμμα αξιολόγησης υποκειμένων ξανάρχισε μετά το 1974 και επεκτάθηκε τις δεκαετίες 1990 και 2000 από τους Χρ. Οικονομίδη (μέχρι και δεκαετία 80), Κ. Γρηγορίου (1989) και Α. Γεωργίου (1991). Περιλαμβάνει αξιολόγηση όλων σχεδόν των εμπορικών ποικιλιών της Κύπρου καθώς και μερικών νέων, σε ένα ευρύ φάσμα υποκειμένων που φαίνονται πιο κάτω (Economides, 1976α; Economides, 1976β; Economides, 1977, (Economides and Gregoriou, 1992; Gregoriou and Economides, 1993; Gregoriou and Economides, 1994, Georgiou and Gregoriou, 1999; Georgiou, 2000α; Georgiou, 2000b; 2000α Georgiou, 2002; Georgiou, 2004).

Υποκείμενα που αξιολογήθηκαν στο ΙΓΕ:

1. Κιτριμηλιά και υβρίδια (*C. aurantium*)
Gou Tou, (*C. taiwanica*)
2. Μανταρινιά και υβρίδια
Cleopatra mandarin, *C. amblycarpa*, Rangpur lime
3. Λεμονιά (*C. limon*)
Rough lemon, Estes rough lemon, Red rough lemon, *C. volkameriana*, *C. macrophylla*
4. Υβρίδια τρίφυλλης πορτοκαλιάς (*Poncirus trifoliata*)
Carrizo citrange, Troyer citrange, Yuma citrange, Morton citrange, C- 32 citrange, C- 35 citrange, C.R.C. citremon, Swingle citrumelo
5. Λιμεττίας (*C. aurantifolia*)
6. Palestine sweet lime

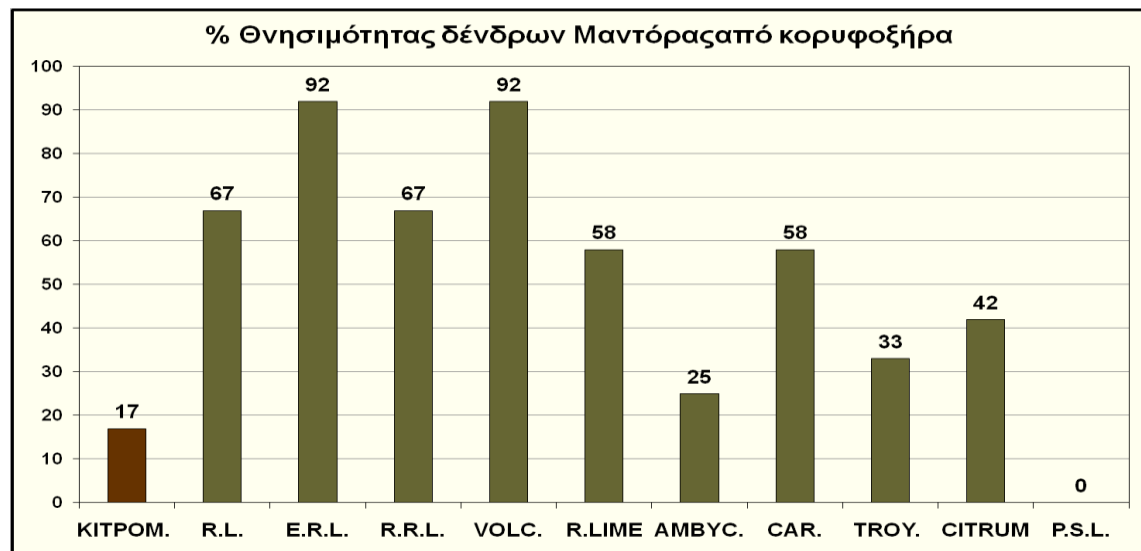
Η αντικατάσταση της κιτρομηλιάς δεν είναι εύκολη αφού το υποκείμενο που θα την αντικαταστήσει πρέπει να είναι ανεκτικό και σε άλλους περιοριστικούς παράγοντες για τα εσπεριδοειδή στην Κύπρο και κυρίως στο ασβέστιο του εδάφους, στα ιοειδή και σε άλλες ασθένειες, καθώς και στην έλλειψη νερού, ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να δίνει καλή παραγωγή και ποιότητα καρπού. Τα αποτελέσματα του ΙΓΕ (Γεωργίου, 2010) έδειξαν σαν υποσχόμενα τα υποκείμενα Volkameriana, Cleopatra mandarin, Carrizo

citrange και Troyer citrange. Αναλυτικά τα αποτελέσματα για 4 ποικιλίες και για ασβεστούχα και μη εδάφη φαίνονται στον Πίνακα 1.1. που ακολουθεί.

Πίνακας 1.1. Υποσχόμενα Υποκείμενα για αντικατάσταση της κитρομηλιάς

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΕΔΑΦΗ	
	ΑΣΒΕΣΤΟΥΧΑ ΚΑΙ ΜΗ	ΜΗ ΑΣΒΕΣΤΟΥΧΑ
ΒΑΛΕΝΤΣΙΑ	Volkameriana Cleopatra mandarin	Carrizo citrange Troyer citrange
ΝΟΒΑ ΚΛΗΜΕΝΤΙΝΗ	Volkameriana	Carrizo citrange Troyer citrange
MARSH SEEDLESS	Volkameriana	Carrizo citrange Swingle citrumelo
MANTOPA	Palestine sweet lime C. amblycarpa	Carrizo citrange Troyer citrange

Επίσης, μελετήθηκε για την ποικιλία Μαντόρα σε σχέση με τα διάφορα υποκείμενα η ευπάθεια στην κορυφοξήρα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 1.1. που ακολουθεί.



Σχήμα 1.1. Ευπάθεια διαφόρων υποκειμένων στην κορυφοξήρα (Γεωργίου, 2010).

1.4. Ιολογικές και συναφείς ασθένειες εσπεριδοειδών (εκτός της τριστέζας)

Οι ιολογικές ασθένειες των εσπεριδοειδών προκαλούνται από διάφορους ιούς και ιοειδή ενώ οι συναφείς από φυτοπλάσματα και βακτήρια. Παρασιτούν το ζωντανό πρωτόπλασμα, εξαπλώνονται διασυστηματικά και μεταδίδονται με εμβόλια ή με άλλο τρόπο αγενούς πολλαπλασιασμού. Έτσι, αν μέρος του προσβεβλημένου φυτού χρησιμοποιηθεί σαν πολλαπλασιαστικό υλικό τα νέα φυτά που παράγονται είναι μολυσμένα από τις αντίστοιχες ασθένειες με τις οποίες ήταν προσβεβλημένο το μητρικό φυτό. Οι ασθένειες αυτές ονομάζονται και εμβολιομεταδιδόμενες (graft-transmissible diseases). Τα εσπεριδοειδή προσβάλλονται από πολλές ιολογικές και συναφείς ασθένειες (περισσότερες από 80), πολλές από τις οποίες είναι ακόμα αγνώστου αιτιολογίας (Whiteside *et al.*, 1989). Παρά το ότι το παθογόνο αίτιο μερικών από τις ασθένειες αυτές δεν είναι ακόμα γνωστό, η μετάδοση τους με εμβόλια και η απουσία κλασσικού μικροβίου που να σχετίζεται μ' αυτές τις ταυτοποιεί σαν ιολογικές ή συναφείς ασθένειες (Κυριακοπούλου και Δήμου, 2008; Κυριακού κ.α., 2002; Παναγόπουλος 1993; Whiteside *et al.*, 1989). Οι κυριότερες ιολογικές και συναφείς ασθένειες των εσπεριδοειδών και τα παθογόνα που τις προκαλούν φαίνονται στον Πίνακα 1. 2.

Πίνακας 1. 2. Οι κυριότερες ιολογικές και συναφείς ασθένειες των εσπεριδοειδών και τα παθογόνα που τις προκαλούν

Ασθένεια	Παθογόνο (Γένος/Οικογένεια)	Συντ/φία
Τριστέζα	Citrus tristeza virus (Closterovirus/Closteroviridae)	CTV
Ψώρωση	Citrus psorosis virus (Ophiovirus)	CPsV
Κοίλη ψώρωση (concave gum)	Δεν είναι γνωστό	
Θυλακοειδής ψώρωση (blind pocket)	Δεν είναι γνωστό	
Λιθίαση ή πέτρωμα (impietratura)	Δεν είναι γνωστό	
Κριστακόρτις (cristacortis)	Δεν είναι γνωστό	

Μολυσματική ποικιλόχρωση	Citrus variegation virus Parvivirus/Bromoviridae	CVV
Ζαρωμένο φύλλο	Citrus leaf rugose virus Citrus crinkly leaf virus (Parvivirus/Bromoviridae)	CLRV CCLV
Ξυλώδεις όγκοι κιτρομηλιάς Sour orange woody galls	Δεν είναι γνωστό	
Εξωκόρτης	Citrus exocortis viroid (Pospiviroid/Pospiviroidae)	CEVd
Καχεξία ή ξυλοπόρωση	Hop stunt viroid	HSVd
Σταμπορν ή μικροφυλλία	<i>Spiroplasma citri</i>	
	Citrus leaf rugose virus	CLRV
Δακτυλιωτή κηλίδωση (Ringspot)	Citrus ringspot virus	CRSV
Νανισμός Σατσούμα (Satsuma dwarf)	Satsuma dwarf virus Citrus mosaic virus Natsudaidai dwarf virus Navel orange infectious mottling virus	SDV CiMV NDV NiMV
Κουρελιασμένο φύλλο- νανισμός του σιτράνζ (Tatter leaf and Citrange Stunt)	Citrus Tatter leaf virus (Capillovirus)	CTLV
Γλωσσίδια των νεύρων- Ξυλώδης όγκος (Vein enation-Woody Gall)	Δεν είναι γνωστό	
Αλγερινός Ιός της Ομφαλοφόρας πορτοκαλιάς (Algerian Navel Orange virus)	Algerian Navel Orange virus	
Κιτρίνισμα Εύθραστου Κλαδίσκου (Brittle Twig	Δεν είναι γνωστό (μοιάζει με στάμπορν)	

Yellows)		
Citrus Yellow Mottle (Κίτρινη ποικιλόχρωση εσπεριδοειδών)	Δεν είναι γνωστό	
Θανατηφόρος ίκτερος (Fatal Yellows Disease)	Δεν είναι γνωστό	
Fovea	Δεν είναι γνωστό	
Θήλακες κόμμεος και βοθρίωση με κόμμι (Gum pocket and Gummy pitting)	Δεν είναι γνωστό	
Βοθρίωση του φλοιού (Gummy bark)	Δεν είναι γνωστό	
Σκούπα της μάγισσας (Witches' -Broom)	<i>Phytoplasma aurantifolia</i> (φυτόπλασμα)	
Ίκτερος των νευρώσεων (Yellow vein)	Δεν είναι γνωστό	
Λέπρωση (Leprosis)	Mite-vectored bacilliform virus	
Πρασίνισμα η Ασθένεια του κίτρινου δράκου (Greening/Huanglongbing)	<i>Candidatus Liberobacter citri</i> Asiaticus <i>Candidatus Liberobacter citri</i> Africanus <i>Candidatus Liberobacter citri</i> Americanus	
Ξαφνικός θάνατος εσπεριδοειδών (Citrus sudden death)	Citrus sudden death-associated virus Marafivirus/Tymoviridae	
Θανατικό (Blight/ Declinio)	Δεν είναι γνωστό	

1.4.1. Εξάπλωση των ιολογικών ασθενειών των εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται στις περιοχές με γεωγραφικό πλάτος 41° από τον Ισημερινό στο βόρειο και στο νότιο ημισφαίριο της γης. Είναι γνωστά για περισσότερα από 4000 χρόνια και είναι ενδημικά στη νοτιοανατολική Ασία, από την περιοχή της ανατολικής Αραβίας μέχρι τις Φιλιππίνες, από τα Ιμαλάια μέχρι την Ινδονησία και την Αυστραλία (Davies and Albrigo, 1994). Καλλιεργούνται στις περιοχές αυτές της Ασίας από αρχαιοτάτων χρόνων και από εδώ άρχισε η διάδοση τους και σε άλλες περιοχές του πλανήτη με ευνοϊκό για την καλλιέργεια τους κλίμα.

Πιθανολογείται ότι οι ιοί και άλλες συναφείς μολυσματικές οντότητες υπήρχαν από την αρχαιότητα σε εσπεριδοειδή που καλλιεργούνταν στην Κίνα και στην Ιαπωνία. Επειδή όμως ο πολλαπλασιασμός τους γινόταν με σπόρο οι ιώσεις δεν μεταδίδονταν. Όλες οι ιώσεις όμως μεταδίδονται με εμβολιασμό και έτσι με την εμφάνιση της ασθένειας της κομμώσης (*Phytophthora parasitica* ή *Phytophthora citrophthora*) κατά τον 19^ο αιώνα, και του πολλαπλασιασμού των εσπεριδοειδών με εμβολιασμό, άρχισε η εξάπλωση των ιώσεων (Bar Joseph *et al.*, 1989). Από το 1890 η εσπεριδοκαλλιέργεια επεκτάθηκε ραγδαία και μεγάλοι αριθμοί δενδρυλλίων νέων ειδών μεταφέρονταν από μια χώρα σε άλλη με πλοία. Έτσι, από περιοχές όπου υπήρχαν οι διάφορες ιώσεις μεταφέρθηκαν σε καθαρές περιοχές (Bar Joseph *et al.*, 2005).

Κλασικό παράδειγμα της διάδοσης των ιώσεων αποτελεί ο ιός της τριστεύζας ο οποίος προκάλεσε την πρώτη σοβαρή επιδημία το 1930 στην Αργεντινή, όπου και καταστράφηκαν πολλές νέες φυτείες πορτοκαλιών που ήταν εμβολιασμένες σε κιτρομηλιά. Το 1937, η ασθένεια εμφανίστηκε και στη Βραζιλία, χώρα που έχει την πρώτη θέση σε παραγωγή εσπεριδοειδών παγκόσμια (Bar-Joseph, *et al.*, 1989).

Η τριστεύζα λόγω της μετάδοσης της και με έντομα φορείς, έχει καταστρέψει ολοσχερώς εκατομμύρια δένδρα, ενώ πολλά άλλα έχουν καταστεί μη παραγωγικά λόγω της καχεξίας, της μικροκαρπίας, της χλώρωσης και άλλων σοβαρών συμπτωμάτων που προκαλεί η ασθένεια (Bar-Joseph, *et al.*, 1989; Παναγόπουλος, 1993; Roistacher and Gumpf., 1986; Roistacher, 1995; Whiteside, *et al.*, 1989).

1.4.2. Αντιμετώπιση ιολογικών και συναφών ασθενειών των εσπεριδοειδών

Οι ασθένειες που οφείλονται σε ιούς, ιοειδή και φυτοπλάσματα δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με χημικά ή άλλα μέσα σε αντίθεση με την αντιμετώπιση των ασθενειών που οφείλονται σε μύκητες και βακτήρια. Η αντιμετώπιση τους στηρίζεται στην πρόληψη που μπορεί να γίνει με την λήψη των πιο κάτω μέτρων:

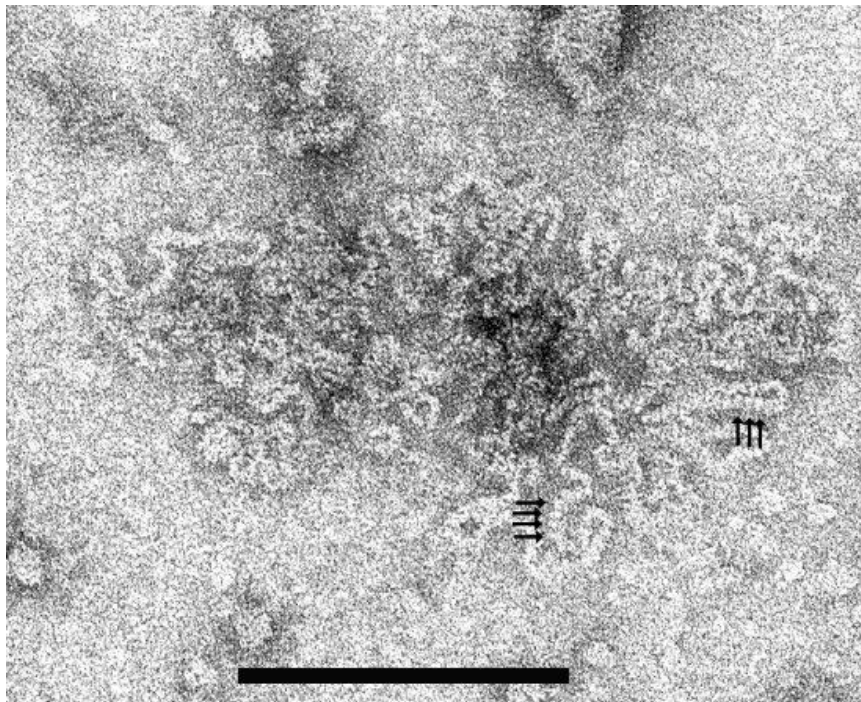
1. Με τη χρήση ελεγμένου και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών και την εγκατάσταση νέων φυτειών και τον επανεμβολιασμό παλαιότερων.
2. Αποφυγή επανεμβολιασμού προσβεβλημένων δένδρων.
3. Αποφυγή χρήσης εμβολίων από δένδρα που δεν είναι ελεγμένα και μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί φορείς ιώσεων.
4. Αποφυγή διακίνησης εμβολίων από την μια φυτεία στην άλλη.
5. Με εκριζώσεις προσβεβλημένων δένδρων ή και φυτειών.
6. Με καταπολέμηση των αφίδων φορέων
7. Αποφυγή εισαγωγής μολυσμένων εμβολίων από άλλες χώρες
8. Σε περιπτώσεις εισαγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού από άλλες χώρες να γίνεται έλεγχος και στην χώρα εισαγωγής και μετά να εγκαθίσταται στις φυτείες
9. Με αντικατάσταση του υποκειμένου της κιτρομηλιάς σε περιπτώσεις περιοχών με μεγάλη προσβολή τριστεζας και κατάλληλες εδαφοκλιματολογικές συνθήκες για τα νέα υποκείμενα.
10. Λήψη μέτρων απολύμανσης για αποφυγή μετάδοσης με μηχανικά μέσα.

1.5. Ιολογικές και συναφείς ασθένειες εσπεριδοειδών που υπάρχουν στην Κύπρο

1.5.1. Τριστέζα (Γίνεται αναφορά πιο πάνω στο σημείο 1.1)

1.5.2. Ψώρωση

Η ασθένεια προκαλείται από τον ιό της Ψώρωσης (*Citrus psorosis virus*, CPsV) που ανήκει στο γένος *Ophiovirus*. Ο ιός είναι μονονηματιδιακός και τρισωματιδιακός. Έχει λεπτά νηματοειδή σωματίδια τριών μηκών, διαμέτρου 3-4 nm και συνήθως κυκλικής περιμέτρου (Εικόνα 1.10) με RNA αρνητικής πολικότητας συνολικού μήκους 11.278 νουκλεοτιδίων και καψιδιακή πρωτεΐνη MB 43-50 KD.



Εικόνα 1.10. Ηλεκτρονική μικρογραφία ιοσωματίου CPsV (<http://www.dpvweb.net>)

Συμπτώματα: Προκαλεί απολέπιση του φλοιού του κορμού, των κλάδων και βραχιόνων του δένδρου συνοδευόμενη συχνά από εκροή κόμμεως (Εικόνα 1.11). Ακολουθεί αποφλοιώση, σταδιακή παρακμή και τελικά ξήρανση του δένδρου. Στα φύλλα σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίζονται χλωρώσεις σε σχήμα φύλλου δρυός (Εικόνα 1.12). Τα

συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως από το 5^ο-20^ο έτος της ηλικίας του δένδρου (Κυριακού κ.ά., 2002).



Εικόνα. 1.11. Απολέπιση του φλοιού του κορμού που προκλήθηκε από τον ιό της ψώρασης.



Εικόνα. 1.12. Χλωρώσεις σε σχήμα φύλλου δρυός που προκλήθηκε από τον ιό της ψώρασης.

Ο ιός της ψώρασης μεταδίδεται με μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό.

1.5.3. Μολυσματική Ποικιλόχρωση

Οφείλεται στον ιό της μολυσματικής ποικιλόχρωσης (*Citrus Infectious variegation virus*) του γένους *Parvivirus*.

Συμπτώματα: Ο ιός προκαλεί παραμόρφωση και ποικιλόχρωση φύλλων (Εικόνα 1.13) και καρπών. Η διάδοση του στην Κύπρο είναι περιορισμένη (Κυριακού κ.ά., 2002).



Εικόνα 1.13. Παραμόρφωση και ποικιλόχρωση φύλλων που προκλήθηκε από τον ιό της Μολυσματικής Ποικιλόχρωσης.

1.5.4. Πέτρωμα ή Λιθίαση

Το παθογόνο αίτιο της ασθένειας αυτής που μεταδίδεται με εμβόλια δεν είναι γνωστό θεωρείται όμως ιός (*Citrus impietratura*).

Συμπτώματα: Προκαλεί σμίκρυνση και σκλήρυνση του καρπού και θύλακες κόμμεως στους καρπούς (Εικόνα 1.14). Είναι διαδεδομένη σε παλιές φυτείες βοτρυοκάρπου, Βαλέντσια, Γιαφίτικα, Περγαμόντ κ.ά (Κυριακού κ.ά., 2002)



Εικόνα 1.14. Συμπτώματα Λιθίασης σε Βοτρυοκάρπο και Βαλέντσια

1.5.5. Ιοειδή

Τα ιοειδή είναι τα μικρότερα φυτοπαθογόνα, αποτελούνται από ελεύθερο κυκλικό ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) και περιέχουν 246-400 νουκλεοτίδια και είναι σταθερά σε ψηλές θερμοκρασίες και εκτός του φυτικού κυττάρου για μέρες.

Ανήκουν σε διαφορετικά γένη της οικογένειας Pospiviroidae και χωρίζονται στις πιο κάτω κατηγορίες:

- CBLVd (CVdI) *Citrus bent leaf viroid* (315-329 νουκλεοτίδια) ανήκει στο γένος Apscaviroid.
- HSVd (CVdII) *Hop stunt viroid* (295-303 νουκλεοτίδια) ανήκει στο γένος Hostuviroid.
- CDVd (CVdIII) *Citrus dwarfing viroid* (291-297 νουκλεοτίδια) ανήκει στο γένος Apscaviroid.
- CBCVd (CVdIV) *Citrus bark cracking viroid* (284-286 νουκλεοτίδια) ανήκει στο γένος Cocadviroid.
- CEVd *Citrus exocortis viroid* (370-375 νουκλεοτίδια) ανήκει στο γένος Pospiviroid (Flores *et al.*, 2005).

Το φυτό κιτριά, Etrog citron (*Citrus medica* L.), selection Arizona 861-1S, χρησιμοποιείται σαν δείκτης για το ιοειδές του εξωκόρτη (CEVd) και άλλα συναφή ιοειδή (Roistacher, 1991). Οι κιτριές που είναι προσβεβλημένες με εξωκόρτη και άλλα ιοειδή παρουσιάζουν συμπτώματα, όπως καρούλιασμα φύλλων, συστροφή φύλλων (Εικόνα 1.15), καστανές και μελανές ραβδώσεις στο βλαστό και στους κλαδίσκους, ξήρανση κλαδίσκων, νέκρωση μίσχου, νέκρωση νεύρων φύλλου και νανισμό του φυτού. Τα συμπτώματα αυτά είναι σοβαρότερα όταν η κιτριά προσβληθεί με εξωκόρτη και ηπιότερα όταν προσβληθεί με άλλα ιοειδή όπως τα CVdI, HSVd, CVdIII και CVdIV (Duran-Vila *et al.* 1988; Semancik, 1988).



Εικόνα 1.15. Συστροφή φύλλων σε κιτριά προσβεβλημένη με ιοειδή

Προσβολή με ένα από αυτά τα ιοειδή προκαλεί μόνον ένα από τα πιο πάνω συμπτώματα, όπως κηλίδωση του μίσχου του φύλλου ή πολύ ήπια επιναστεία φύλλων. Σε ένα δένδρο όμως μπορεί να συνυπάρχει το ιοειδές του εξωκόρτη και ομάδα άλλων ιοειδών μικρότερου μοριακού βάρους. Τα ιοειδή προκαλούν σοβαρές ζημιές στα εσπεριδοειδή στις περιπτώσεις χρήσης ευπαθών υποκειμένων. Μεταδίδονται με μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό και με μηχανικά μέσα, όπως μολυσμένα εργαλεία.

Οι κυριότερες ασθένειες που προκαλούν τα ιοειδή στα εσπεριδοειδή είναι ο **Εξωκόρτης** (Εικόνα 1.16), που έχει σαν παθογόνο αίτιο το ιοειδές *Citrus exocortis viroid* (CEVd) ή σύμπλεγμα ιοειδών και η **Καχεξία** (Εικόνα 1.17), που προκαλείται από το ιοειδές του λυκίσκου (*Hop stunt viroid* - HSVd).

Ο Εξωκόρτης προκαλεί αποφλοίωση του κεντρικού βλαστού κάτω από το σημείο εμβολιασμού σε ευπαθή υποκείμενα όπως η Γλυκολεμονιά, τα Citranges, Rangpur κ.ά. Η κιτρομηλιά είναι ανεκτικό υποκείμενο στα ιοειδή. Το ποσοστό προσβολής στην Κύπρο είναι πολύ ψηλό (90%) (Kyriakou, 1992), αλλά λόγω της χρήσης της κιτρομηλιάς ως υποκειμένου εσπεριδοειδών, στο παρόν στάδιο δεν παρουσιάζονται συμπτώματα στα δένδρα (Kyriakou *et al.*, 2005).



Εικόνα. 1.16. Μαντόρα εμβολιασμένη σε υποκείμενο Troyer στο οποίο παρατηρούνται σχισμές στο φλοιό που προκλήθηκαν από προσβολή με εξωκόρτη .



Εικόνα 1.17. Μαντόρα εμβολιασμένη σε υποκείμενο Troyer στο οποίο παρατηρούνται σχισμές στο φλοιό που προκλήθηκαν από προσβολή με εξωκόρτη.

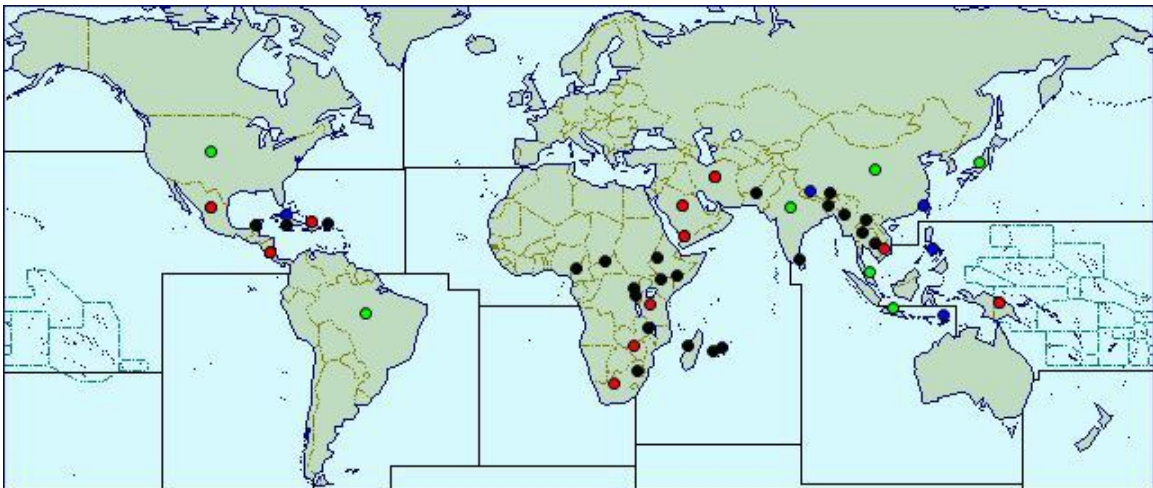
Η Καχεξία ή Ξυλοπώρωση προκαλεί ξήρανση κλαδίσκων, βαθμιαία παρακμή του δένδρου και εμφάνιση κόμμεως στον φλοιό πάνω από το σημείο εμβολιασμού.

Είναι διαδεδομένη στα μανταρινοειδή (Κλημεντίνες, Nova, Αρακαπά, Μαντόρες, Minneola, Orlando κ.ά), αλλά λόγω της χρήσης της κίτρομηλιάς ως υποκειμένου εσπεριδοειδών που είναι ανεκτική δεν παρουσιάζονται σοβαρά συμπτώματα στα δένδρα στο παρόν στάδιο (Καπαρή-Ησαία κ.α., 2006).

1.6. Σημαντικές ιολογικές και συναφείς ασθένειες των εσπεριδοειδών που δεν απαντώνται στην Κύπρο

1.6.1. Πρασίνισμα των Εσπεριδοειδών ή ασθένεια του Κίτρινου Δράκου (Greening ή Huanglongbing)

Το πρασίνισμα ή χλώρωση των Εσπεριδοειδών ή ασθένεια του Κίτρινου Δράκου των εσπεριδοειδών (Greening ή Huanglongbing) θεωρείται μια από τις σοβαρότερες ασθένειες των εσπεριδοειδών και προκαλείται από το βακτήριο *Candidatus Liberobacter citri* (*Asiaticus*, *Africanus*, *Americanus*). Η ασθένεια είναι γνωστή και με το όνομα Dieback στην Ινδία, Huanglongbing στην Κίνα, Likubin στην Ταϊβάν και κίτρινοι βλαστοί (Yellow shoot) στο Βιετνάμ. Είναι διαδεδομένη σε αρκετές χώρες παραγωγής εσπεριδοειδών κυρίως του Νοτίου ημισφαιρίου όπως φαίνεται στο χάρτη που ακολουθεί (Εικόνα 1.18). Οι τρεις μορφές του βακτηρίου παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες (Bove, 2006). Η *Asiaticus* αποτελεί πολύ μολυσματική μορφή που αντέχει ως 35 °C , η *Africanus* αποτελεί ήπια μορφή και δεν αντέχει σε θερμοκρασίες άνω των 32 °C, ενώ η *Americanus* που απαντάται στην Βραζιλία μοιάζει με την *Africanus*.



Εικόνα 1.18. Διάδοση της ασθένειας του πρασινίσματος

<http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=16567&loadmodule=datasheet&page=481&site=144>

Η ασθένεια μπορεί να προκαλέσει απώλεια της παραγωγής από 30-100% σε 7-10 χρόνια και έχει καταστρέψει εκατομμύρια δένδρα στις χώρες που ενδημεί. Το βακτήριο και οι φορείς του δεν υπάρχουν στην Ευρώπη αλλά ο κίνδυνος εισαγωγής τους είναι υπαρκτός. Η ασθένεια καταστρέφει την παραγωγή, την εμφάνιση και την οικονομική αξία των δένδρων. Τα προσβεβλημένα δένδρα παράγουν παραμορφωμένα, σκληρά και πικρά φρούτα και καταστρέφονται μετά από μερικά χρόνια. Τα σπέρματα παρουσιάζονται κακοσχηματισμένα με καστανό χρώμα. Τα φύλλα παρουσιάζουν χλώρωση (Εικόνα 1.19 και 1.20) και παραμορφώσεις. Τα δένδρα παρουσιάζουν καχεξία, νανισμό, αποφύλλωση, και ξήρανση κλαδίσκων. Τα συμπτώματα μπορεί να παρουσιάζονται σε όλο το δένδρο ή τμήμα του. Σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να υπάρξει λανθάνουσα προσβολή και να μην παρουσιάζονται συμπτώματα (Polek *et al.*, 2007) .



Εικόνα 1.19. Χλώρωση σε φύλλα προσβεβλημένα με την ασθένεια του Greening (Α. Κυριακού)



Εικόνα 1.20. Χλώρωση σε φύλλα προσβεβλημένα με την ασθένεια του Greening, συμπτώματα σε φρούτα και το έντομο φορέας (M. Bar-Joseph)

Μεταδίδεται με πολλαπλασιαστικό υλικό και με δύο είδη των εντόμων φορέων, τις Ψύλλες:

α) την Αφρικανική ψύλλα των εσπεριδοειδών (Εικόνα 1.20, 1.21) *Trioza erytreae* (Homoptera: Triozidae). Η διάρκεια ανάπτυξης του εντόμου είναι 25-38 ημέρες σε θερμοκρασία 23°C. Η μακροβιότητα του ενήλικου ανέρχεται περίπου σε 80 ημέρες και το αναπαραγωγικό δυναμικό του έως 2.500 αυγά. Είναι πολύ ευαίσθητο σε υψηλές θερμοκρασίες (32°C) οπότε δεν εκκολάπτονται τα αυγά και υπάρχει μεγάλη θνησιμότητα όλων των σταδίων. Είναι ανθεκτικό σε χαμηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 1.21. Αφρικανική ψύλλα των εσπεριδοειδών (http://america.pink/trioza-erytreae_4524905.html)

β) Ασιατική ψύλλα των εσπεριδοειδών (Εικόνα 1.22) *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). Η διάρκεια ανάπτυξης του εντόμου είναι 13-17 ημέρες σε θερμοκρασία 25°C. Η μακροβιότητα του ενήλικου ανέρχεται στις 90 ημέρες ή και περισσότερες. Το αναπαραγωγικό δυναμικό του είναι περίπου 800 ωά και μπορεί να επιβιώσει σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (κάτω των 4°C και άνω των 34°C).



Εικόνα 1.22. Ασιατική ψύλλα των εσπεριδοειδών (<https://entomologytoday.org/tag/diaphorina-citri/>)

1.6.2. Ξαφνικός θάνατος εσπεριδοειδών (*Citrus sudden death*)

Ο ιός *Citrus sudden death-associated virus*, ανήκει στην οικογένεια *Tymoviridae*, γένος *Marafivirus*. Κατάστρεψε 1 εκατομμύριο δένδρα στη Βραζιλία εμβολιασμένα σε υποκείμενα Rangpur lime. Τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται ένα με δύο έτη από την μόλυνση. Τρία μέχρι επτά έτη μετά την μετάδοση το δένδρο σταματά την παραγωγή καρπών και πέντε με οκτώ έτη από την μετάδοση το δένδρο νεκρώνεται. Δεν υπάρχει θεραπεία της ασθένειας (Roman *et al.*, 2004). Στις εικόνες 1.23 και 1.24 φαίνονται συμπτώματα της ασθένειας.



Εικόνα 1.23. Συμπτώματα από τον *Citrus sudden death-associated virus* που εμφανίζονται κάτω από το φλοιό του κορμού (Α. Κυριακού).



Εικόνα 1.24. Καταστροφή δένδρων από τον *Citrus sudden death-associated virus* (Α. Κυριακού).

1.8.3. Θανατικό (Declinio –Blight)

Η ασθένεια αυτή υπάρχει στις ΗΠΑ και Βραζιλία αλλά είναι άγνωστο το παθογόνο αίτιο. Μεταδίδεται όπως οι ιώσεις. Στην εικόνα 1.25. που ακολουθεί φαίνονται συμπτώματα που προκαλεί η ασθένεια σε φρούτα, φύλλα και δένδρα (Lee et al., 1984).



Εικόνα 1.25. Συμπτώματα που προκαλεί η ασθένεια του θανατικού σε φρούτα, φύλλα και δένδρα (Α. Κυριακού)..

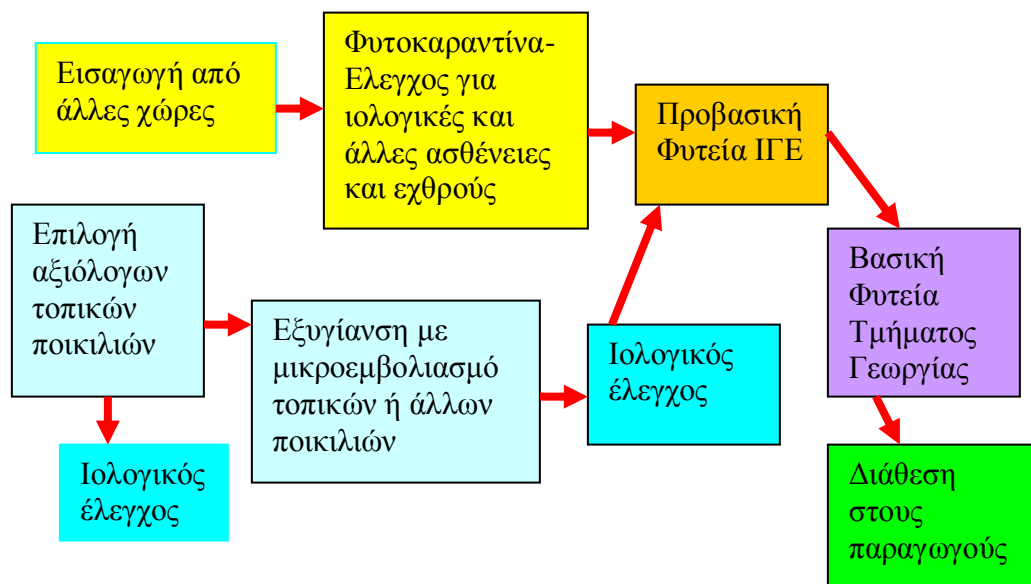
1.10. Εξυγίανση και Παραγωγή Ελεγχμένου Πολλαπλασιαστικού Υλικού εσπεριδοειδών

Η εξυγίανση του πολλαπλασιαστικού υλικού και η απαλλαγή του από ιούς, ιοειδή και φυτοπλάσματα είναι πολύ σημαντική για την παραγωγή ελεγχμένου πολλαπλασιαστικού υλικού των εσπεριδοειδών όπως και άλλων δένδρων που πολλαπλασιάζονται με αγενή πολλαπλασιασμό. Οι ιοί και τα συναφή παθογόνα δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με χημικά ή άλλα μέσα και μεταδίδονται με τον αγενή πολλαπλασιασμό των φυτών. Έτσι, η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού είναι απαραίτητη για την πρόληψη των ιολογικών ασθενειών και των τεράστιων ζημιών που προκαλούνται απ' αυτές.

Στο Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών εφαρμόζεται από το 1992 Πρόγραμμα παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού στα εσπεριδοειδή. Το Πρόγραμμα αυτό, έχει σαν κύριο στόχο την παραγωγή, διατήρηση και διάθεση στους παραγωγούς και φυτωριούχους υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού αξιόλογων παραδοσιακών και

εισαγόμενων ποικιλιών. Στα εργαστήρια και θερμοκήπια του ΙΓΕ διεξάγεται εξυγίανση καθώς και έλεγχος των δενδρυλλίων για ύπαρξη ιώσεων και συναφών ασθενειών. Επίσης, διατηρούνται Προβασικές Φυτείες στους Σταθμούς του ΙΓΕ για διατήρηση των υγιών δενδρυλλίων (Καπαρή-Ησαΐα, 2006; Gavriel, 2002; Kyriakou, 2009).

Στο Σχήμα 1.2. που ακολουθεί φαίνονται τα διάφορα στάδια παραγωγής και εξυγίανσης πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών στην Κύπρο.



Σχήμα 1.2. Στάδια προγράμματος παραγωγής ελεγχμένου πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών στην Κύπρο

Για παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού παραδοσιακών ποικιλιών, το επιθυμητό πολλαπλασιαστικό υλικό υποβάλλεται σε εξυγίανση με μεριστωματική καλλιέργεια ή μικροεμβολιασμό *in vitro* και το υγιές υλικό που παράγεται πολλαπλασιάζεται περαιτέρω.

Το υλικό που παράγεται με τους δύο αυτούς τρόπους εισάγεται στις Προβασικές Φυτείες του Ινστιτούτου που στεγάζονται σε εντομοστεγή δικτυοκήπια στο Ζύγι. Εκεί τα δενδρύλλια φυτεύονται σε γλάστρες των 70 λίτρων (Εικόνα 1.28). Συνήθως διατηρούνται

3 δενδρύλλια για κάθε είδος. 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, είσοδο 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, εκδίδεται στο Τμήμα Γεωργίας, το οποίο έχει την ευθύνη για την διατήρηση του σε μητρικές φυτείες και για παραγωγή εμβολίων για διάθεση στους φυτωριούχους και παραγωγούς.



Εικόνα 1.26. Δενδρύλλια εσπεριδοειδών σε γλάστρες στο δικτυοκήπιο (Προβασική Φυτεία Εσπεριδοειδών)

1.11. Στόχοι

Κύριος στόχος της παρούσας εργασίας είναι:

η ενδεδειγμένη μελέτη του ιού της τριστεύζας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο καθώς και η ανάπτυξη νέων τρόπων αντιμετώπισης του.

Ειδικοί στόχοι της εργασίας είναι:

1. Χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεύζας και κατάταξη τους με βάση τα διεθνή πρότυπα.
2. Διερεύνηση δυνατότητας βιολογικής διάγνωσης του ιού *in vitro*
3. Αξιολόγηση των υποσχόμενων υποκειμένων εσπεριδοειδών ως προς την ανεκτικότητα τους σε σοβαρή κυπριακή απομόνωση του ιού.
4. Βελτιστοποίηση μεθόδων εξυγίανσης πολλαπλασιαστικού υλικού.
5. Μελέτη σταυροειδούς προστασίας από σοβαρή απομόνωση του ιού με χρήση άλλης ήπιας κυπριακής απομόνωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στα πλαίσια της πειραματικής εργασίας που διεξήχθηκε χρησιμοποιήθηκαν οι πιο κάτω μέθοδοι:

2.1. Βιολογική μέθοδος ανίχνευσης του ιού της τριστεύζας

Η μέθοδος αυτή συνίσταται στην τεχνητή μόλυνση φυτών δεικτών Μεξικανικής λιμεττίας, Mexican Lime (*Citrus aurantifolia*, *Christm. Swingle*) που με την εκδήλωση χαρακτηριστικών συμπτωμάτων υποδηλούν την ύπαρξη της συγκεκριμένης ίωσης.

Τα προσβεβλημένα φυτά δείκτες παρουσιάζουν τα εξής συμπτώματα:

- A) Διαφάνεια των νευρώσεων των φύλλων (Εικόνα 2.1),
- B) Ελαφρά συστροφή της άνω επιφάνειας του ελάσματος των φύλλων (Εικόνα 2.2),
- Γ) Νανισμό (Εικόνα 2.3) και
- Δ) Βοθρίωση του ξύλου (Εικόνα 2.4).

Η τεχνητή μόλυνση γίνεται συνήθως με εμβολιασμό μέρους του φλοιού του προς εξέταση δένδρου στα φυτά-δείκτες (Kyriakou and Polycarpou 1989; Roistacher, 1991).



Εικόνα 2.1. Διαφάνεια των νευρώσεων των φύλλων

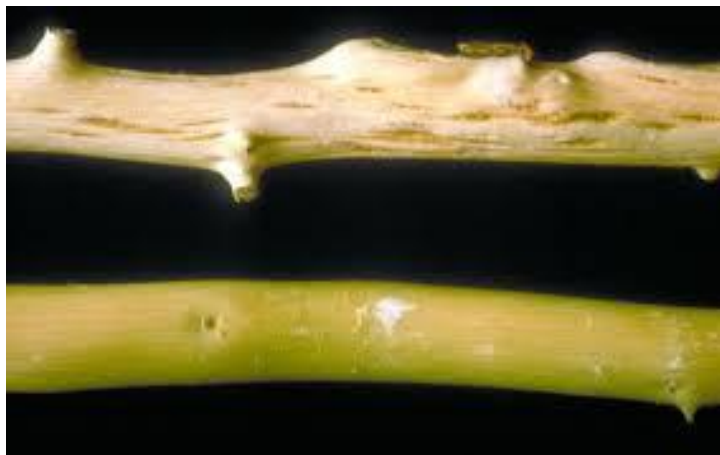
(<http://www.horticulture.tamu.edu>)



Εικόνα 2.2. Ελαφρά συστρόφη της άνω επιφάνειας του ελάσματος των φύλλων
(www.scielo.org.ar)



Εικόνα 2.3. Νανισμός (Α. Κυριακού, 2004)



Εικόνα 2.4 Βοθρίωση του ξύλου (www.plantvillage.com)

Τα δενδρύλλια που είναι προσβεβλημένα παρουσιάζουν ένα ή περισσότερα από τα συμπτώματα που παρουσιάζονται στις πιο πάνω εικόνες.

2.2. Βιολογική Μέθοδος Διάγνωσης του ιού της τριστεζας *in vitro*

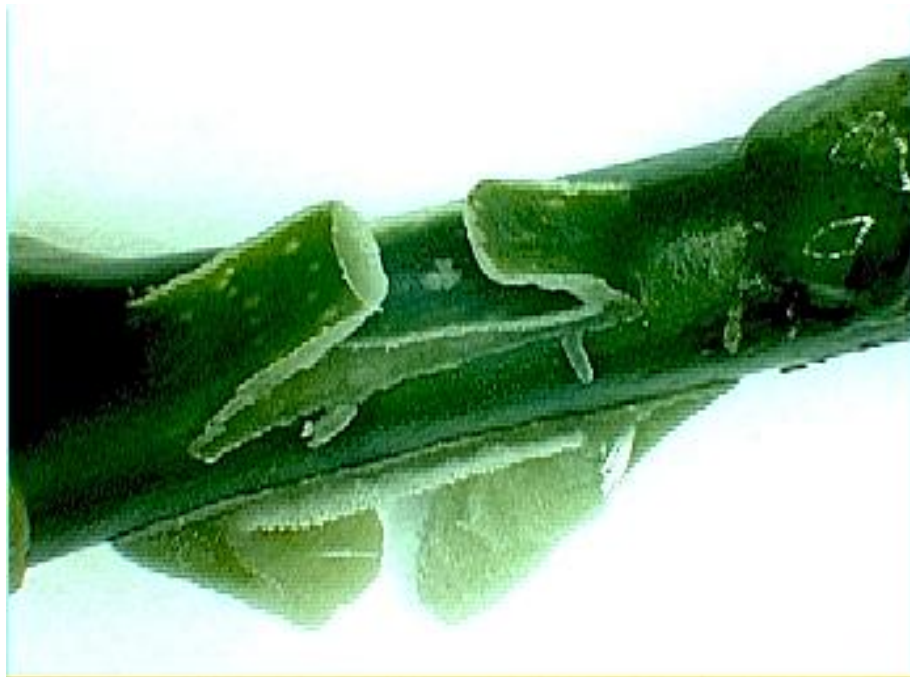
Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ώστε να διαπιστωθεί η δυνατότητα διάγνωσης του ιού της τριστεζας *in vitro* με χρήση μοσχευμάτων του φυτού δείκτη της Μεξικανικής λιμεττίας.

Η μέθοδος αυτή που αναπτύχθηκε το 2007 (Karagi-Isaia *et al.*, 2007), για διάγνωση των ιοειδών των εσπεριδοειδών εκτός θερμοκηπίου αποτελεί συνδυασμό της βιολογικής διαγνωστικής μεθόδου με χρήση συγκεκριμένου φυτοδείκτη και της μεθόδου του μικροεμβολιασμού σε σωλήνα.

Κατά την αρχική μέθοδο διάγνωσης των ιοειδών χρησιμοποιήθηκαν μοσχεύματα κιτριάς μήκους 1.5-2 cm που έφεραν 1-2 οφθαλμούς και μολύνθηκαν τεχνητά με ιοειδή. Πριν από τον εμβολιασμό τα μοσχεύματα αποστειρώθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης (15%) + Tween 20 (1%) και ξεπλύθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες. Έγιναν τεχνητές μολύνσεις των μοσχευμάτων με εμβολιασμό φλοιού (τυφλοί εμβολιασμοί) από τα προς εξέταση δένδρα. Στο μόσχευμα έγινε τομή σχήματος «H» και εκεί τοποθετήθηκε το εμβόλιο

(Εικόνα 2.5). Η εργασία αυτή έγινε με τη χρήση στερεομικροσκοπίου υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα "μικροεμβολιασμένα" μοσχεύματα κιτριάς τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα με άλατα MS (Murashige & Skoog,1962), ή Lloyd and McCown (1980) εμπλουτισμένο με phytagel και σακχαρόζη (Πίνακας 2.1). Ακολούθως, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (22-25 °C) και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Αμέσως μετά την έκπτυξη των φύλλων από τα μοσχεύματα κιτριάς *in vitro* αρχίζει η λήψη παρατηρήσεων ως προς την εκδήλωση συμπτωμάτων στα μικρόφυτα καθώς και μετρήσεων του ύψους σε τακτά εβδομαδιαία διαστήματα μετά την μόλυνση.

Κατά την εργασία αυτή θα ακολουθηθεί η πιο πάνω διαδικασία αλλά θα χρησιμοποιηθεί ο φυτοδείκτης της Μεξικανικής λιμεττίας.



Εικόνα 2.5. Μικροεμβολιασμός φλοιού σε μόσχευμα κιτριάς

Πίνακας 2.1. Θρεπτικά υποστρώματα για φύτευση μικρομοσχευμάτων εσπεριδοειδών *in vitro* (pH 5,7)

Συστατικό	Ποσότητα (mg)	
	Murashige & Skoog Θρεπτικό υπόστρωμα	Lloyd and McCown Θρεπτικό υπόστρωμα
KNO ₃	1900	1900
NH ₄ NO ₃	1650	400
CaCl ₂	332,02	72,50
Ca(NO ₃) ₂ ·2H ₂ O		471,26
MgSO ₄	1900	180,54
KH ₂ PO ₄	170	170
K ₂ SO ₄		990
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	22,30
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	0,83
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6	8,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025
FeNaEDTA	36,70	36,70
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	37,25
Sucrose	30 000	75 000
Myo-Inositol	100	100
Thiamine HCl	0,10	1
Pyridoxine.HCl	0,50	0,50
Nicotinic acid	0,50	0,50
Glycine	2	2
Phytigel	3000	3000

2.3. Ορολογική μέθοδος- Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA

Η πιο γνωστή και διαδεδομένη ορολογική τεχνική για τη διάγνωση των ιών που προσβάλλουν τα φυτά είναι η ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA (Ενζυμική ανοσοπροσροφική μέθοδος προσδιορισμού/ Enzyme linked immunosorbent assay). Η συγκεκριμένη τεχνική αναπτύχθηκε περί τα τέλη της δεκαετίας του 1970 και σε γενικές γραμμές στηρίζεται στην ανίχνευση της σύνδεσης εξειδικευμένων αντισωμάτων που αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο αντιγόνο στόχο (καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού). Η ανίχνευση της σύνδεσης αντισώματος και αντιγόνου (ιού) αποδεικνύει την ύπαρξη του ιού στο υπό εξέταση δείγμα όπως για παράδειγμα φυτικό ιστό (Clark and Adams, 1977).

Η ορολογική δοκιμή ELISA εξακολουθεί να παραμένει η πλέον διαδεδομένη μέθοδος διάγνωσης φυτοϊών καθώς και άλλων φυτοπαθογόνων οργανισμών. Πρόκειται για μια ευαίσθητη, γρήγορη και απλή τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον μαζικό έλεγχο δειγμάτων και να δώσει αποτελέσματα σε δύο ημέρες. Αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν διάφορες κατηγορίες και τύποι αυτής της τεχνικής οι κυριότερες από τις οποίες αναφέρονται ως άμεση (direct) ELISA και έμμεση (indirect) ELISA.

Στην Κύπρο, εδώ και αρκετά χρόνια ο έλεγχος των φυτών για την ύπαρξη ιολογικών ασθενειών γίνεται με την άμεση ELISA, διπλού αντισώματος (DAS ELISA). Η διαδικασία, τα στάδια και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι ως εξής:

Διαδικασία

Στάδιο 1. Προσρόφηση εξειδικευμένου αντισώματος γ-σφαιρίνης (IgG)

Τα αντισώματα εξασφαλίζονται από εμπορικές εταιρείες, αραιώνονται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης και τοποθετούνται σε ειδική μικροπλάκα πολυστερενίου (100μl/φρεάτιο). Ακολουθεί επώαση της μικροπλάκας στους 37°C για 3 ώρες ή στους 4-8°C για 16 ώρες, και πλύσιμο της για τρεις φορές με τρίλεπτα διαλείμματα με το διάλυμα PBS-Tween.

Στάδιο 2. Επώαση των δειγμάτων

Μικρή ποσότητα του υπό εξέταση φυτικού υλικού εκχυλίστηκε σε διάλυμα εξαγωγής (PBS Tween με 2% PVP και 0.2% BSA), και 100 μl εκχυλίσματος από το κάθε δείγμα

τοποθετήθηκαν σε κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας (Εικόνα 2.6), η οποία επωάζεται τελικά ολονύκτια στους 4°C.

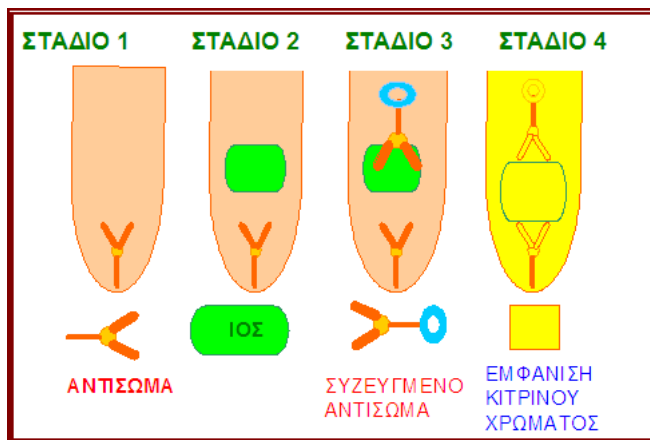
Στάδιο 3. Προσθήκη συζευγμένου αντισώματος με αλκαλική φωσφατάση (conjugated IgG)

Την επόμενη μέρα, μετά το πλύσιμο της μικροπλάκας με PBS-Tween ακολουθεί αραιώση και τοποθέτηση στη μικροπλάκα 100 μl συζευγμένου αντισώματος (IgG conjugated) σε ειδικό διάλυμα συζεύγματος. Η μικροπλάκα επωάζεται για 3 ώρες στους 37°C και ακολουθεί πλύσιμο με PBS-Tween.

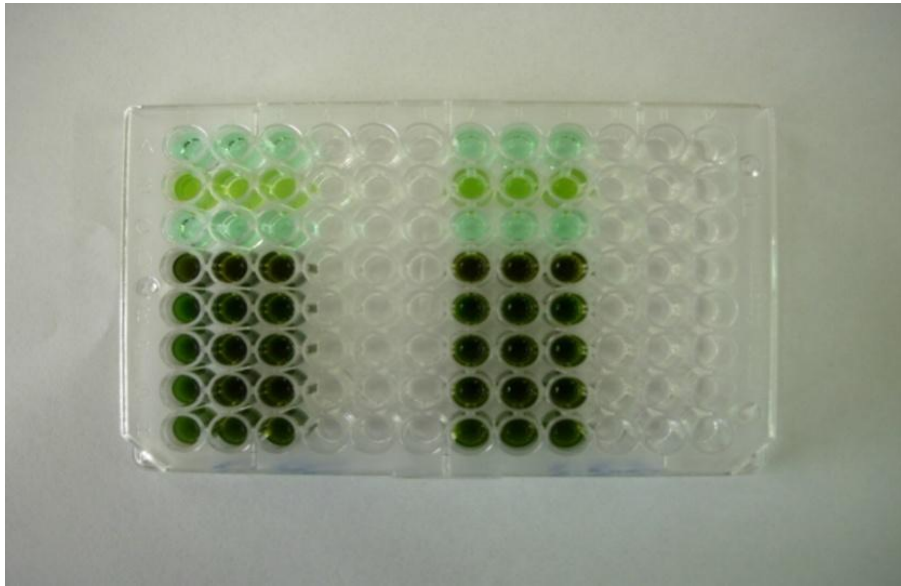
Στάδιο 4. Αντίδραση υποστρώματος

Τοποθετούνται 100μl/φρεάτιο φωσφορικής παρα-νιτροφαινόλης (p-nitrophenyl phosphate, PNPP), σε διάλυμα υποστρώματος σε συγκέντρωση 1mg/ml. Μετά από επώαση μιας ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 405 nm. Τα φρεάτια που παρουσιάζουν κίτρινο χρώμα (Εικόνα 2.7), ως αποτέλεσμα της διάσπασης της φωσφορικής παρα-νιτροφαινόλης από το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης, με το οποίο είναι συνδεδεμένο το συζευγμένο αντίσωμα, αντιπροσωπεύουν τα θετικά δείγματα. Κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει οι τιμές των δειγμάτων μας να συγκριθούν με τις αντίστοιχες τιμές των δυο μαρτύρων του θετικού και του αρνητικού (Bar-Joseph, *et al.*, 1979; Cambra, *et al.*, 2002; Κατής, κ.ά. 2001).

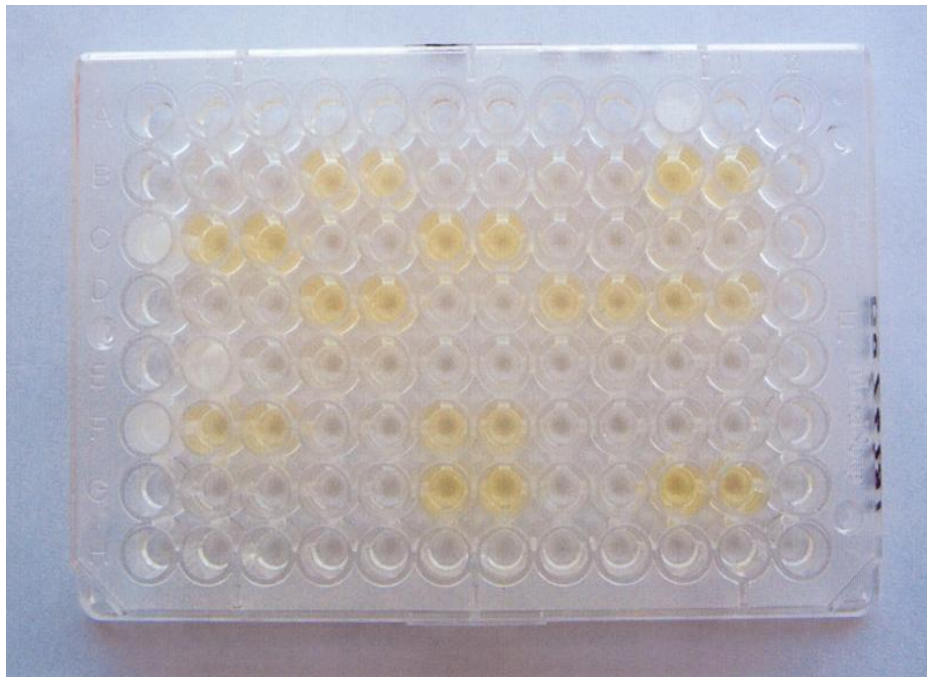
Η τεχνική που αναπτύχθηκε από τους Bar-Joseph and Hadjinicolis, 1994, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο όλων των απομονώσεων που είχαν συλλεχτεί από διάφορες περιοχές της Κύπρου για τον ιό της τριστεζας των εσπεριδοειδών.



Σχήμα 2.1. Διάγραμμα σταδίων DAS ELISA



Εικόνα 2.6. Εργαστηριακός έλεγχος με την μέθοδο **ELISA** (Με πράσινο χρώμα εικονίζονται οι υποδοχές της πλακέτας που περιέχουν χυμό από τα προς εξέταση δένδρα).



Εικόνα 2.7. Εργαστηριακός έλεγχος με την μέθοδο **ELISA** . Με κίτρινο χρώμα εικονίζονται στην πλακέτα τα δείγματα που είναι προσβεβλημένα με τον ιό της τριστέζας.

Πίνακας 2.2. Χημικά υλικά, αντιδραστήρια, πλαστικά, αναλώσιμα και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες των πειραμάτων των ορολογικών δοκιμών

	Είδος Υλικού	Εταιρεία/Τύπος	Αρ. Καταλόγου/ Τύπος
Υλικά και Εξοπλισμός ορολογικών δοκιμών	Αντισώματα για διάγνωση CTV (KIT)	Bioreba , AG	1072-06
	Διάλυμα πλύσης (PBS Tween), επίστρωσης (Coating buffer), σύζευξης (Conjugate buffer) και υποστρώματος (Substrate buffer)	Bioreba, AG	110110, 110120, 110122, 110123
	Παρανιτροφαινόλη (PNPP)	Sigma-Aldrich Co.	N-9389
	Πλάκες πολυστηρενίου 96 θέσεων	Nunc	F96 Maxisorp 442404
	Σετ Μικροσιφώνια (20, 100, 1000 μl)	Gilson	F167700
	Μικροσιφώνια πολλαπλών θέσεων (200 μl)	Gilson	F 14803
	Ακροφύσια	Gilson	F 167103
	Εργαστηριακό ψυγείο (2-10°C)	Sanyo	-----
	Θάλαμος επώασης 37°C	Sanyo	MIR 162/262
	Σύστημα αυτόματης πλύσης μικροπλακών	Bioreba, AG	600000
	Μετρητής οπτικής πυκνότητας	Bio-Rad Laboratories	Model 680 reader
	Ομογενοποιητής Φυτικού Υλικού	Bioreba, AG	Homex 6, 40006
	Σακουλάκια ομογενοποίησης	Bioreba, AG	430100
Ζυγός ακριβείας	Precisa	BJ410C	
Χημικά αντιδραστήρια	NaCl	Sigma-Aldrich Co.	S9888
	PVP-40	Sigma-Aldrich Co.	PVP-40T
	BSA (αλβουμίνη μόσχου)	Sigma-Aldrich Co.	A 4503
	Na ₂ SO ₃	BDH	10357
	Δωδέκυλο θειικό νάτριο (SDS)	Sigma-Aldrich Co.	L3771
	Οξικό Κάλιο	Sigma-Aldrich Co.	T6878
	Κιτρικό οξύ	Sigma-Aldrich Co.	251275
	Tween-20	Sigma-Aldrich Co.	P9416
	EDTA	GIBCO	15575
	TE	Invitrogen Life Technologies	12090-015
	Tris-HCl	Invitrogen Life Technologies	12090-025
	DEPC Water	Invitrogen Life Technologies	96-2224

2.4. Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεξας

Διενεργήθηκε αρχικά η εξαγωγή ιικού RNA του ιού από τους προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς των απομονώσεων που είχαν συλλεχθεί από διάφορες περιοχές της Κύπρου (Nakahara, *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 2000). Στη συνέχεια, έγινε ενίσχυση του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού με τη μέθοδο της «Αντίστροφης μεταγραφής και της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης» (RT-PCR). Επίσης, έγινε προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας και σύγκριση με δημοσιευμένες απομονώσεις ώστε να χαρακτηριστούν οι απομονώσεις του ιού σε μοριακό επίπεδο (Gillings *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1993; Sambade *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2003; Parayiannis *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2007; Sambade *et al.*, 2007). Τα χημικά, τα αντιδραστήρια μοριακής βιολογίας και το σύνολο του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.6**.

2.4.1. Επεξεργασία και αποθήκευση των απομονώσεων του ιού της τριστεξας πριν την μοριακή ταυτοποίηση

Οι απομονώσεις του CTV, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, προήλθαν από διάφορους ξενιστές και γεωγραφικές περιοχές της Κύπρου. Τα δείγματα είχαν συλλεχθεί στο πλαίσιο επισκοπήσεων που πραγματοποιήθηκαν σε φυτείες εσπεριδοειδών, από όλες τις επαρχίες της ελεύθερης Κύπρου. Κάθε δείγμα αποτελείτο από κορυφές προσβεβλημένων δένδρων μήκους 20 εκατοστών, που τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες και μεταφέρθηκαν στα Εργαστήρια Φυτοπαθολογίας του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών (ΙΓΕ) της Κύπρου όπου εμβολιάστηκαν σε υποκείμενα κитρομηλιάς και Μεξικανικής λιμεττίας, ενώ παράλληλα αποθηκεύτηκαν σε υπερκαταψύκτες (-80°C).

Πίνακας 2.3. Χημικά υλικά, αντιδραστήρια μοριακής βιολογίας, πλαστικά αναλώσιμα και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες των πειραμάτων.

	Είδος Υλικού	Εταιρεία	Αρ. Καταλόγου/ Τύπος
Χημικά Υλικά	NaCl	Sigma-Aldrich Co.	S6191
	PVP-40	Sigma-Aldrich Co.	PVP-40T
	BSA	Sigma-Aldrich Co.	A 4503
	Na ₂ SO ₃	BDH	10357
	Glycine	Sigma-Aldrich Co.	G8898
	Triton-X	Sigma-Aldrich Co.	T6878
	Tween-20	Sigma-Aldrich Co.	P9416
	EDTA	GIBCO	15575
	TE	Invitrogen Life Technologies	12090-015
	Tris-HCl	Invitrogen Life Technologies	12090-025
	DEPC Water	Invitrogen Life Technologies	96-2224
	Διάλυμα TAE 50X	Qiagen	129237
	Βρωμιούχο αιθίδιο	Invitrogen Life Technologies	15585-011
	Lubria broth base	Invitrogen Life Technologies	127950-027
	LB Agar powder	Invitrogen Life Technologies	22700-025
	LB Broth Liquid	Invitrogen Life Technologies	10955-01
	S.O.C. medium	Invitrogen Life Technologies	15544-034
Ενζυμα και Αντιδραστήρια Μοριακής Βιολογίας	Platinum Taq Polymerase	Invitrogen Life Technologies	10966-034
	IQ5 supermix	Bio-Rad Laboratories	170 8860
	Superscript III Reverse Transcriptase	Invitrogen Life Technologies	10966-022
	dNTP's	Invitrogen Life Technologies	R72501
	Εκκινητές/ανιχνευτές	MWG-Biotech AG	-----
	Μεμβράνες hybond N ⁺	Roche Diagnostics	1209299
	Plant RNeasy Kit	Qiagen	69104
	Pure Link HQ Mini Plasmid purification Kit		K2100-01

	pCR™4-TOPO® TA Vector	Invitrogen Life Technologies	K457501
Πλαστικά αναλώσιμα	Μικροσωλήνες για PCR (0.2 ml)	Eppendorf	0030124332
	Μικροσωλήνες 2 ml	Eppendorf	0030120094
	Μικροπλάκες 96 θέσεων	Bio-Rad Laboratories	MLL9601
	Μεμβράνη κάλυψης (Seal-film)	Bio-Rad Laboratories	MSB1001
	Ακροφύσια με φίλτρο (Filter tips)	Molecular Bioproducts	ART2065E
	Τρυβλία Petri		
	Πλαστικές Λούπες (loops) μιας χρήσης		
	Πλαστικοί αναμίκτες (spreaders)		
Εξοπλισμός	Θερμοκυκλοποιητής συμβατικής PCR	MJ Research	PTC-200
	Φυγόκεντρος για μικροπλάκες 96 θέσεων	Eppendorf	5804R
	Φυγόκεντρος για μικροσωλήνες 2 ml	Eppendorf	5414R
	Θερμαινόμενη πλάκα και αναδευτήρας	Stuart Scientific	SBH130DC
	Ηλεκτρονικά μικροσιφόνια (σετ)	Eppendorf	4861000147
	Συσκευές ηλεκτροφόρησης/ηλεκτροδότησης	Bio-Rad Laboratories	166-0792EDU
	Σύστημα UV και ψηφιακής φωτογράφισης	Vilber Lourmat	Infinity-1000
	Ασηπτικός Θάλαμος για μίγματα PCR	LabCaire	PCR 8
	Καταψύκτης -80	Sanyo	U3286S
	Καταψύκτης -25	Libiere	-----
	Ζυγός ακριβείας	Precisa	BJ410C

2.4.2. Προετοιμασία των δειγμάτων για τις μοριακές δοκιμές ανίχνευσης

2.4.2.1. Απομόνωση ολικού RNA

Για την εξαγωγή ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν 0,2 γραμμάρια φρέσκου φυτικού ιστού (μίσχος φύλλου και φλοιός βλαστού). Η διαδικασία έγινε με τη χρήση του εμπορικού σκευάσματος Plant RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Εν συντομία, τα δείγματα λειοτριβήθηκαν στο

διάλυμα RLC σε αναλογία 1/10, επώαστηκαν με το ένζυμο DNase I για αποικοδόμηση του DNA και διηθήθηκαν μέσα από τη μικροστήλη Qiashredder η οποία φιλτράρει τα φυτικά κατάλοιπα. Κατόπιν, το διήθημα αναμίχτηκε σε νέο μικροσωλήνα με μισό όγκο αλκοόλης (96%) και τοποθετήθηκε μέσα στη μικροστήλη RNeasy mini spin column, η οποία είναι κατασκευασμένη από διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂) και δεσμεύει το RNA. Μετά από δύο διαδοχικά ξεπλύματα της στήλης με τα διαλύματα πλύσης RW1 και RPE, το δεσμευμένο RNA εκχυλίστηκε σε 50 μl απεσταγμένου νερού μοριακής βιολογίας. Η ποσότητα και η καθαρότητα του τελικού προϊόντος μετρήθηκε με το σύστημα Quanti-iTTM RNA Assay Kit (Molecular ProbesTM; Invitrogen Life technologies, Carlsbad, USA) και το RNA αποθηκεύτηκε στους -76 °C μέχρι τη διεξαγωγή των δοκιμών.

2.4.3. Μοριακή ενίσχυση του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης κυπριακών απομονώσεων του CTV με RT-PCR

Για τη μοριακή ταυτοποίηση του CTV με τη συμβατική RT-PCR, χρησιμοποιήθηκε ένα εργαστηριακό πρωτόκολλο που περιελάμβανε τη γενικευμένη ενίσχυση του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης (CP) μεγέθους 669 ζευγών βάσεων (bp). Το μίγμα αντίδρασης της RT-PCR περιείχε 10 mM Tris-HCl (pH:8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP's, 1 μονάδα ενζύμου Platinum Taq PCR polymerase, 20 μονάδες αναστολέα RNAσών, RNaseOUT, 10 μονάδες αντίστροφη μεταγραφάση (Maloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Superscript III), 0,5 μM ανοδικού και καθοδικού εκκινητή CTV1 και CTV10 (Πίνακας 3) (Nolasco *et al.*, 2002), αντίστοιχα, και 2 μl ολικού RNA από το κάθε δείγμα. Το μίγμα συμπληρώθηκε με νερό μοριακής καθαρότητας σε τελικό όγκο 50 μl. Η διαδικασία ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή PTC 200 (MJ Research) και το προφίλ ενίσχυσης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο θερμικής επώασης στους 50°C για 40 λεπτά (αντίστροφη μεταγραφή), ένα στάδιο αποδιάταξης στους 94°C για 4 λεπτά, 35 κύκλους στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 51°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 45 δευτερόλεπτα. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο επώασης στους 72°C για 10 λεπτά. 10 μl από το κάθε προϊόν ενίσχυσης διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1,5% αгарόζης για 1 ώρα σε τάση 100V, εμβαπτίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (1 mg/ml) για 25

λεπτά και παρατηρήθηκε-φωτογραφήθηκε κάτω από UV ακτινοβολία. Κατόπιν, τα προϊόντα της ηλεκτροφόρησης αφαιρέθηκαν από την αγαρόζη με τη βοήθεια αποστειρωμένης λεπίδας και το DNA καθαρίστηκε από την αγαρόζη με το εμπορικό σκεύασμα Pure Link Gel Extraction Kit (Invitrogen).

2.4.4 Μοριακή κλωνοποίηση και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Ακολούθησε μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR με το εμπορικό σκεύασμα TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) που περιλαμβάνει το βακτήριο *Esherichia coli* (Invitrogen BV, Cronigen, The Netherlands): $F^+ mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 recA1 deoR araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$. Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν με τη χρήση του πλασμιδιακού φορέα pCR®4-TOPO® (Invitrogen, The Netherlands). Συγκεκριμένα, η διαδικασία της κλωνοποίησης περιελάμβανε την ένθεση του προϊόντος της PCR στον πλασμιδιακό φορέα, τον μετασχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων (competent cells) με την είσοδο σε αυτά του πλασμιδίου και την επιλογή και ανάλυση δέκα λευκών αποικιών για την ανίχνευση της ένθεσης (προϊόν PCR). Για την παρασκευή του μίγματος κλωνοποίησης, προστέθηκαν σε αποστειρωμένο μικροσωλήνα, 2μl προϊόντος PCR, 1μl διάλυμα με τον πλασμιδιακό φορέα και 2μl νερό. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη ενός μl διαλύματος αναστολής της κλωνοποίησης (6x TOPO Cloning Stop Solution) και ο μικροσωλήνας μεταφέρεται στον πάγο. Αμέσως μετά ακολουθεί η διαδικασία του μετασχηματισμού των επιδεκτικών κυττάρων. Ένας μικροσωλήνας με επιδεκτικά κύτταρα μεταφέρεται από τους -80°C σε πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 2 μl του μίγματος με τον πλασμιδιακό φορέα, ελαφρά ανάδευση και ο μικροσωλήνας τοποθετείται στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά του μικροσωλήνα σε θερμόλουτρο σε θερμοκρασία 42°C για 30 δευτερόλεπτα, στη συνέχεια τοποθετείται πάλι στον πάγο και προστίθενται 250μl θρεπτικού μέσου SOC που βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το φιαλίδιο τοποθετείται σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης στους 37°C για 60 λεπτά.

Στο χρονικό αυτό διάστημα, προετοιμάζονται κατάλληλα, τρυβλία Petri με LB άγαρ που περιέχει αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$. Ποσότητα 40μl X-Gal συγκέντρωσης

40mg/ml προστίθεται σε κάθε τρυβλίο και ακολούθως μεταφέρονται στους 37°C για μισή ώρα. Στη συνέχεια, σε κάθε τρυβλίο προσθέτονται 100μl διαλύματος των μετασχηματισμένων βακτηρίων, απλώνονται με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου και τοποθετούνται στους 37°C για 16-24 ώρες. Επιλέγονται δέκα λευκές αποικίες οι οποίες μεταφέρονται σε αποστειρωμένους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 3ml υγρό LB θρεπτικό μέσο και αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100μg/ml και τοποθετούνται σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης (225 rpm) στους 37°C για 14-16 ώρες. Για την εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα, High Purity Plasmid Midiprep System (Life Technologies™, MD, USA). Καλλιέργεια κυττάρων (40 ml) φυγοκεντρήθηκε στις 5000 σ/λ για 10 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα κρατήθηκε, διαλύθηκε με τη βοήθεια ενός διαλύματος (200 mM NaOH, 1% δωδεκυλοθειικό νάτριο β/ο) για 5 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 15000 g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο διάλυμα τοποθετήθηκε σε στήλη που περιέχει στρώμα ρητίνης με ικανότητα ανταλλαγής ανιόντων (τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα φωσφόρου του DNA, αλληλεπιδρούν με τα θετικά φορτισμένα φορτία της ρητίνης και δεσμεύονται στην επιφάνειά της). Η στήλη ξεπλύθηκε δύο φορές με 10 ml διαλύματος μειωμένης αλατότητας που επιτρέπει την παραμονή του πλασμιδιακού DNA στη ρητίνη. Στη συνέχεια, το πλασμιδιακό DNA εκλούστηκε με τη βοήθεια διαλύματος υψηλής αλατότητας και συλλέχθηκε σε αποστειρωμένο μικροσωλήνα στον οποίο προστέθηκε ισοπροπανόλη σε αναλογία 7/10. Το μίγμα αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 14000 σ/λ για 30 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, το ίζημα του πλασμιδιακού DNA ξεπλύθηκε με διάλυμα 70% αλκοόλης και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 14000 σ/λ για 5 λεπτά. Η αλκοόλη απομακρύθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει. Τελικά το DNA αναδιαλύθηκε σε 200μl διαλύματος TE.

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε την μέθοδο διδεοξυ-αναλόγων του Sanger (ρυθμιζόμενη διακοπή της αντιγραφής του DNA). Και οι δύο νουκλεοτιδικές αλυσίδες του προϊόντος της PCR στον πλασμιδιακό φορέα προσδιορίστηκαν διαδοχικά σε αναλυτή ABI Prism 3700 DNA, με τη χρήση του πακέτου "ABI PRISM® BigDye™ Terminators v3.0" (Applied biosystems, Foster City, CA) με αποστολή τους στην εταιρεία Microsynth, AG. Οι αλληλουχίες εξετάστηκαν για

ομοιότητες με τις καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων του NCBI (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, USA) με εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST.

2.4.5. Επεξεργασία Μοριακών δεδομένων και Φυλογενετικές αναλύσεις

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν στοιχήθηκαν και συναρμολογήθηκαν με τη χρήση του BioEdit Sequence Alignment Edition (Έκδοση 7.0.5.2) (Hall, 1992). Η σύγκριση των αλληλουχιών που προέκυψαν από τις περιοχές μελέτης του CTV της Κύπρου με αντίστοιχες δημοσιευμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και αμινοξέων καταχωρημένων στη βάση NCBI πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του αλγόριθμου Blast2. Για τον προσδιορισμό των γενετικών αποστάσεων και των ποσοστών ομοιότητας μεταξύ των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Mega Έκδοση 3.1 (Saito and Nei, 1987; Kumur et al., 2001). Η πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα Clustal X (Thompson et al., 1994, 1997). Για τον υπολογισμό των δένδρων Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood), χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό PHYML (South France Bioinformatics Platform <http://www.atgc-montpellier.fr/>) (Guindon and Gascuel, 2003).

2.5. Μέθοδοι εξυγίανσης πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών

Για την εξυγίανση του πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι όπως η θερμοθεραπεία, η θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών, η μεριστωματική καλλιέργεια, ο μικροεμβολιασμός και η χημειοθεραπεία. Οι μέθοδοι αυτές μπορεί να εφαρμοστούν και σε συνδυασμό μεταξύ των για εξυγίανση συγκεκριμένων παθογόνων (Varveri *et al.*, 2015).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι πιο πάνω μέθοδοι για απαλλαγή του πολλαπλασιαστικού υλικού από τον ιό της τριστεζας και από τα ιοειδή CEVd και HSVd.

Ακολουθεί περιγραφή των μεθόδων εξυγίανσης που χρησιμοποιήθηκαν.

2.5.1. Τεχνική θερμοθεραπείας

Τα μολυσμένα δενδρύλλια εκκολάπτονται σε θαλάμους με θερμοκρασίες που κυμαίνονται συνήθως στους 30-40 °C για 6 μέχρι 12 βδομάδες. Η απαλλαγή ολόκληρου του φυτού από τον ιό είναι συνήθως αδύνατη χωρίς να προκληθούν πολύ σοβαρές ζημιές ή και ολοκληρωτική αποξήρανση του φυτού από την ψηλή θερμοκρασία στην οποία είναι εκτεθειμένο. Ο ιός μπορεί να είναι ανενεργός σε νέους βλαστούς αλλά όχι σε παλαιότερους ή στις ρίζες. Στις περισσότερες περιπτώσεις μετά την θερμοθεραπεία μωσχεύματα ή εμβόλια αφαιρούνται από το δενδρύλλιο που έχει υποστεί θερμοθεραπεία και πολλαπλασιάζονται περαιτέρω για παραγωγή νέων υγιών φυτών. Σε αρκετές περιπτώσεις η παραγωγή νέων υγιών φυτών διενεργείται με ιστοκαλλιέργεια *in vitro* μεριστωμάτων που προέρχονται από τα μητρικά δενδρύλλια ή μωσχεύματα που έχουν υποστεί θερμοθεραπεία (Calavan *et al.*, 1972 Muhammad *et al.*, 2005).

Η θερμοθεραπεία χρησιμοποιήθηκε για εξυγίανση του ιού της τριστεύζας.

2.5.2. Θερμοθεραπεία *in vitro*

Η θερμοθεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί με καλλιέργεια βλαστών του μητρικού φυτού *in vitro* (Manganaris *et al.*, 2003; Postman and Hadidi, 1995). Οι βλαστοί αυτοί, αφού ολοκληρωθεί η θερμοθεραπεία, μπορεί να πολλαπλασιαστούν *in vitro* για παραγωγή νέων υγιών φυτών. Σε ορισμένες περιπτώσεις η παραγωγή νέων υγιών φυτών διενεργείται με ιστοκαλλιέργεια *in vitro* μεριστωμάτων που προέρχονται από τα μητρικά μωσχεύματα που έχουν υποστεί θερμοθεραπεία.

Η θερμοθεραπεία *in vitro* χρησιμοποιήθηκε για εξυγίανση του ιού της τριστεύζας

2.5.3. Θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών *in vitro*

Παρόμοια με την προηγούμενη μέθοδο θερμοθεραπείας *in vitro* όπου οι βλαστοί επωάζονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (4-10 °C) και χρησιμοποιείται για εξυγίανση των ιοειδών (Paduch-Cichal and Kryczyński, 1987; Adams *et al.*, 1996). Οι βλαστοί αυτοί αφού ολοκληρωθεί η θερμοθεραπεία μπορεί να πολλαπλασιαστούν *in vitro* για παραγωγή νέων υγιών φυτών. Σε ορισμένες περιπτώσεις η παραγωγή νέων υγιών φυτών διενεργείται με ιστοκαλλιέργεια η μικροεμβολιασμό *in vitro* μεριστωμάτων που προέρχονται από τα μητρικά μωσχεύματα που έχουν υποστεί θερμοθεραπεία.

Η θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών *in vitro* χρησιμοποιήθηκε για εξυγίανση των ιοειδών CEVd και HSVd.

2.5.4. Τεχνική ιστοκαλλιέργειας

Η τεχνική περιλαμβάνει την καλλιέργεια μέρους του φυτού σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα *in vitro* υπό ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο συνεχούς οριζόντιας ροής αποστειρωμένου αέρα (laminar flow). Το θρεπτικό υπόστρωμα βασίζεται συνήθως στο υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962), ή παραλλαγές του που περιλαμβάνει μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία. Ανάλογα με το είδος του φυτού που καλλιεργείται το θρεπτικό υπόστρωμα μπορεί να εμπλουτιστεί με ορμόνες, βιταμίνες και άλλα στοιχεία. Η χρήση του κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος είναι κρίσιμη για την επιτυχία της μεριστωματικής καλλιέργειας (George, 1993b). Όταν το νέο φυτό αναπτυχθεί ικανοποιητικά ακολουθεί η φύτευση του σε χώμα και η σκληραγώγηση του ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί περαιτέρω σε συνθήκες θερμοκηπίου αρχικά και αργότερα περιβάλλοντος (Minas *et al.*, 2007a, Minas *et al.*, 2007b; Gregoriou *et al.*, 2007).

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια μικρομοσχευμάτων *in vitro*.



Εικόνα 2. 8. Θάλαμος σταθεράς θερμοκρασίας και φωτισμού για επώαση φυτών που αναπτύσσονται *in vitro*



Εικόνα 2.9. Ασηπτικός θάλαμος για καλλιέργεια φυτών *in vitro*

2.5.5. Η τεχνική του μικροεμβολιασμού

Ο μικροεμβολιασμός χρησιμοποιείται κυρίως για ξυλώδη είδη που δεν αναπτύσσονται με την μέθοδο της μεριστωματικής καλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα (Navarro 1988, George 1993). Αναπτύχθηκε για πρώτη φορά για εξυγίανση των εσπεριδοειδών από τους Navarro κ.α. το 1975. Έκτοτε, πολλοί επιστήμονες σε όλο τον κόσμο χρησιμοποίησαν την μέθοδο αυτή για εξυγίανση και παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών (Navarro *et al.*, 1975; Navarro *et al.*, 1976; Navarro *et al.*, 1982; Navarro *et al.*, 1991; Skaria *et al.*, 1992; Mukhopadhyay *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2001; Ioannou *et al.*, 1991, Kapari-Isaia *et al.*, 2002; Kapari-Isaia *et al.*, 2004; Kapari-Isaia *et al.*, 2005; Kapari-Isaia *et al.*, 2006; Kapari-Isaia *et al.*, 2007; Kapari-Isaia *et al.*, 2011).

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*.

Κατά την εφαρμογή του μικροεμβολιασμού που γίνεται κάτω από ασηπτικές συνθήκες αφαιρούνται από τα σπορόφυτα- υποκείμενα που έχουν αναπτυχθεί *in vitro* οι κοτυληδόνες και το επικοτόλιο πάνω από τις κοτυληδόνες σε ύψος 2-3 cm. Αφαιρούνται

επίσης, όλα τα πλάγια ριζίδια και μέρος της ρίζας 2 cm περίπου κάτω από τις κοτυληδόνες. Στο πάνω μέρος του υποκειμένου χαράσσεται ένα ανάποδο T και εκεί τοποθετείται το εμφύλιο μεγέθους 0,1-0,2 mm (Εικόνα 2.10).

Η εργασία αυτή γίνεται σε ασηπτικό θάλαμο κάτω από στερεομικροσκόπιο (Εικόνα 2.9). Τα μικροεμβολιασμένα φυτά τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες διαστάσεων 25x150 mm που περιέχουν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με βάση τα άλατα MS και εμπλουτισμένο με ινοσιτόλη, θειαμίνη, πυριδοξίνη και νικοτινικό οξύ (Πίνακας 2.5). Τα εμφύλια μικρόφυτα στο υγρό υπόστρωμα στηρίζονται σε ειδικές γέφυρες που κατασκευάζονται από διηθητικό χαρτί και τοποθετούνται μέσα στους σωλήνες με το υπόστρωμα. Ακολούθως τα μικροφυτά εκκολάπτονται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (22-25 °C) και φωτοπερίοδο 16 ωρών (Εικόνα 2.8). Τα μικροεμβολιασμένα φυτά παρακολουθούνται και σε περίπτωση ανάπτυξης του υποκειμένου πάνω από το σημείο εμφύλιασμού ή στα πλάγια αφαιρούνται οι νέοι αυτοί βλαστοί ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί το μερίστωμα.



Εικόνα 2.10. Μικροεμβολιασμός εσπεριδοειδών κάτω από στερεομικροσκόπιο

Το μέγεθος του ιστού που περιέχει το ακραίο μερίστωμα (καταβολές φύλλων και μερίστωμα) παίζει ρόλο στην επιτυχία του μικροεμβολιασμού. Σε περιπτώσεις που ο ιστός αυτός είναι μεγαλύτερου μεγέθους (0,2-0,7 mm) η επιτυχία μικροεμβολιασμού είναι μεγαλύτερη. Όμως, αν ο ιστός αυτός έχει μικρότερο μέγεθος (0,1-0,15 mm) η επιτυχία παραγωγής υγιών φυτών είναι σε ποσοστό 100%, παρόλο που η επιτυχία μικροεμβολιασμού είναι μικρή (Navarro *et al.*, 1975; Navarro *et al.*, 1976, Karari-Isaia, 2006).

Όταν το νέο φυτό αναπτυχθεί ικανοποιητικά ακολουθεί η φύτευση του σε χώμα ή ο μετεμβολιασμός του σε άλλο ανεπτυγμένο υγιές σπορόφυτο (Εικόνα 2.11 α,β) και η σκληραγώγηση του ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί περαιτέρω σε συνθήκες θερμοκηπίου αρχικά και αργότερα περιβάλλοντος.



Εικόνα 2.11. (α) Μετεμβολιασμός μικρόφυτου σε άλλο ανεπτυγμένο υγιές σπορόφυτο και (β) φύτευση ανεπτυγμένου μικροφυτού του σε χώμα.

Η τεχνική του μικροεμβολιασμού *in vitro* χρησιμοποιήθηκε για εξυγίανση της τριστεύζας και των ιοειδών CEVd και HSVd.

Πίνακας 2.4. Κατάλογος εργαστηριακών συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ιστοκαλλιέργειας, θερμοθεραπείας και μικροεμβολιασμού

	Συσκευή	Χρήση
1	Κάθετος Κλίβανος Αποστείρωσης (Autoclave) Astell	Αποστείρωση αντιδραστηρίων, τεχνητών υποστρωμάτων, νερού κ.α.
2	Οριζόντιος Κλίβανος Αποστείρωσης (Autoclave) Astell	Αποστείρωση αντιδραστηρίων, τεχνητών υποστρωμάτων, νερού κ.α.
3	Θάλαμος Ψυχόμενος Σταθεράς Θερμοκρασίας (Cooled Precision Temperature Incubator) CDR	Θερμοθεραπεία, Επώαση και ανάπτυξη μικροφύτων και μικροεμβολιασμένων φυτών
4	3 Θάλαμοι Ψυχόμενοι Σταθεράς Θερμοκρασίας SANYO Versatile environmental test chamber	Επώαση και ανάπτυξη μικροφύτων και μικροεμβολιασμένων φυτών
5	Ασηπτικός Θάλαμος (Steril-VBH)	Καλλιέργεια μικροφύτων, μικροεμβολιασμός και προετοιμασία υποστρωμάτων
6	Ασηπτικός Θάλαμος (Horizontal Laminar Flow Workstation)	Καλλιέργεια μικροφύτων, μικροεμβολιασμός και προετοιμασία υποστρωμάτων
7	Ασηπτικός Θάλαμος (LABCAIRE)	Καλλιέργεια μικροφύτων, μικροεμβολιασμός και προετοιμασία υποστρωμάτων
8	Στερεομικροσκόπιο Leica	Μικροεμβολιασμοί
9	Στερεομικροσκόπιο Leica EZ4D	Μικροεμβολιασμοί
10	Ψυγείο Whirlpool	Αποθήκευση χημικών και υποστρωμάτων ιστοκαλλιέργειας
11	Ψυγείο Samsung	Αποθήκευση χημικών και υποστρωμάτων ιστοκαλλιέργειας
12	Ψυγείο Electrolux	Αποθήκευση χημικών και υποστρωμάτων ιστοκαλλιέργειας
13	Θερμαινόμενη πλάκα και αναδευτήρας Velp	Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων
14	Ζυγός ακριβείας AND	Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων
15	Ζυγός ακριβείας Adam Afa 120LC	Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων
16	Αποστακτήρας νερού Merit W 4000	Απεσταγμένο νερό
17	Θερμαινόμενα ηλεκτρικά μάτια	Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων
18	Ph meter Selecta	Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων
19	Microwave Whirlpool	Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων

Πίνακας 2.5. Θρεπτικά υποστρώματα για φύτευση σπόρων και μικροεμβολιασμένων φυτών εσπεριδοειδών *in vitro* (pH 5,7)

Συστατικό	Ποσότητα(mg)	
	Σπόροι	Μικροεμβολιασμένα
KNO ₃	1900	1900
NH ₄ NO ₃	1650	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	16,9
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	0,83
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6	8,6
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,25	37,25
Sucrose	30 000	75 000
Inositol(ινοσιτόλη)	-	100
Thiamine HCL(θειαμίνη)	-	0,2
Pyridoxine.HCl (πυριδοξίνη)	-	1
Nicotinic acid(νικοτινικό οξύ)	-	1
Phytigel	3000	-

2.5.6. Χημειοθεραπεία *in vitro*

Η καταπολέμηση του ιών με χρήση χημικών σκευασμάτων όπως η αζιδοθυμιδίνη, η ριμπαβιρίνη, η ακυκλοβίρη κ.ά. που προστίθενται στο θρεπτικό υπόστρωμα της ιστοκαλλιέργειας παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών ή την μετακίνησή τους. Η χρήση χημικών σκευασμάτων συνδυασμένη με μεριστωματική καλλιέργεια μπορεί να οδηγήσει σε εξυγίανση των φυτών από συγκεκριμένους ιούς (Weiland *et al.*, 2004; Sanjeev *et al.*, 2007).

Η χημειοθεραπεία *in vitro* χρησιμοποιήθηκε με χρήση της ριμπαβιρίνης για εξυγίανση του ιού της τριστέζας.

2.5.7. Συνδυασμός των διαφόρων μεθόδων εξυγίανσης

Για εξυγίανση της τριστέζα χρησιμοποιήθηκαν

- A) Θερμοθεραπεία και μεριστωματικός μικροεμβολιασμός
- B) Θερμοθεραπεία *in vitro* και μεριστωματικός μικροεμβολιασμός
- Γ) Χημειοθεραπεία *in vitro* και μεριστωματικός μικροεμβολιασμός

Για εξυγίανση των ιοειδών χρησιμοποιήθηκαν

- A) Η θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών *in vitro* και ο μεριστωματικός μικροεμβολιασμός.
- B) Χημειοθεραπεία *in vitro* και μεριστωματικός μικροεμβολιασμός

2.6. Καταγραφή μετρήσεων και παρατηρήσεων πειραμάτων

Τα δεδομένα των πειραμάτων καταγράφηκαν μέσω μετρήσεων και παρατηρήσεων η και μέσω συνδυασμού και των δύο μεθόδων.

Μετρήσεις και παρατηρήσεις:

Κάθε φυτό που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα στο θερμοκήπιο ή στο εργαστήριο κωδικοποιήθηκε με ένα αριθμό και τοποθετήθηκε σε κάθε γλάστρα ή σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα μια ετικέτα στην οποία καταγράφονταν διάφορα στοιχεία όπως η ημερομηνία μόλυνσης ή φύτευσης, ο αριθμός και το είδος του φυτού, ο αριθμός του μολύσματος και ότι άλλο θεωρήθηκε χρήσιμο για τα πειράματα.

Δεδομένα που καταγράφηκαν ήταν:

1. Το ύψος των φυτών. Το ύψος του κάθε φυτού μετρήθηκε με την βοήθεια μέτρου ή ρίγας σε εκατοστά (cm) ή मिलीμετρα (mm).
2. Εμφάνιση συμπτωμάτων στο ML όπως διαφάνεια νεκρώσεων, καρούλιασμα φύλλων, βοθρίωση ξύλου. Καταγραφή ημερομηνίας εμφάνισης συμπτωμάτων.
3. Εμφάνιση συμπτωμάτων στα φυτά δείκτες.
4. Κανένα σύμπτωμα. Καταγραφή των φυτών που δεν παρουσίασαν κανένα σύμπτωμα.
5. Καταγραφή των αποτελεσμάτων των ELISA tests για τριστέζα Καταγραφή των αποτελεσμάτων των μοριακών tests για τριστέζα και ιοειδή.
6. Φωτογράφιση συμπτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σαν δεδομένα με χρήση φωτογραφικής μηχανής ή στερεοσκοπίου.

(Abd-Elbaki *et al.* 2004; Duran Vila *et al.* 1988; Duran Vila *et al.* 1988; Duran-Vila *et al.* 1991; Ghorbel *et al.* 1998; Nakahara *et al.* 1999; Sano *et al.* 1988; Palacio-Bielsa *et al.* 1999; Semancik 1988).

2.7. Στατιστική Ανάλυση

Όλα τα δεδομένα καταγράφηκαν σε Πίνακες στο Πρόγραμμα Microsoft Excel Programme και ακολούθησε ανάλυση τους (Analysis of variance (ANOVA) με χρήση του στατιστικού προγράμματος “Statgraphics” (1998) που χρησιμοποιείται για σύγκριση διαφορών μεταξύ των πληθυσμών των πειραμάτων που καταγράφονται αριθμητικά (Fisher 1958; Hoshmand 1988; Le Clerg *et al.* 1962; Steel and Torrie 1960).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΥΠΡΙΑΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΤΕΖΑΣ ΤΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

3.1. Περίληψη

Στα πλαίσια των επισκοπήσεων για τον ιό της τριστεζας των εσπεριδοειδών που διεξάγονται στην Κύπρο από το 1992, εντοπίστηκαν δένδρα εσπεριδοειδών προσβεβλημένα με τον ιό της τριστεζας τα οποία παρουσίαζαν διάφορα συμπτώματα που σε μερικές περιπτώσεις ήταν ήπια και δεν μείωναν την παραγωγική ικανότητα του δένδρου, ενώ σε άλλες περιπτώσεις ήταν πολύ σοβαρά. Πενήντα δένδρα (απομονώσεις) προσβεβλημένα με τον ιό της τριστεζας που παρουσίασαν διαφορετικά συμπτώματα στο χωράφι επιλέγηκαν από φυτείες από όλη την Κύπρο. Οι απομονώσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν με την βιολογική μέθοδο με βάση την εκδήλωση συμπτωμάτων που παρουσιάστηκαν σε πέντε φυτά δείκτες (Μεξικανικής λιμεττίας, κιτρομηλιάς, πορτοκαλιάς Washington Navel εμβολιασμένης σε κιτρομηλιά (νεραντζιά), πορτοκαλιάς Madam Vinous και γκρέιφρουτ). Η συγκέντρωση του ιού σε κάθε απομόνωση Ανιχνεύτηκε με την ορολογική μέθοδο ELISA. Οι 50 απομονώσεις κατατάχτηκαν σε ομάδες σε σχέση με τον βιότυπο του ιού και με βάση τα διεθνή πρότυπα κατάταξης τα οποία καταδεικνύουν την σοβαρότητα των φυλών του ιού. Τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού έδειξαν ότι ποσοστό 54% των απομονώσεων του ιού της τριστεζας στην Κύπρο χαρακτηρίζονται σαν ήπιες, ποσοστό 4% πολύ ήπιες, ποσοστό 32% μετρίως σοβαρές ενώ ποσοστό 10% σαν πολύ σοβαρές. Οι σοβαρές απομονώσεις απαντώνται κυρίως στην επαρχία Αμμοχώστου και στην περιοχή Φασουρίου.

3.2. Εισαγωγή

Ο ιός της τριστέζας (*Citrus tristeza virus*) προκαλεί πληθώρα συμπτωμάτων στα δένδρα των εσπεριδοειδών ενώ, σε πολλές περιπτώσεις, τα προσβεβλημένα δένδρα, μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί φορείς της ασθένειας και να αποτελούν εστίες μόλυνσης που μπορούν να μολύνουν άλλα πιο ευπαθή δένδρα (Fraser, 1952; Garnsey *et al.*, 1987; Garnsey and Lee, 1988; Garnsey *et al.*, 1991; Bar-Joseph *et al.*, 1989) Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μόλυνση από ήπια φυλή του ιού, σε ανεκτικότητα της ποικιλίας, στο στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται η ίωση, ή στις συνθήκες του περιβάλλοντος.

Η εκδήλωση των συμπτωμάτων και η σοβαρότητα της ασθένειας έχουν άμεση σχέση με την φυλή του ιού με την οποία είναι προσβεβλημένο ένα δένδρο. Οι φυλές παρουσιάζουν διαφορές ως προς την ανιχνευσιμότητα τους με ορολογικές μεθόδους (Κυριακοπούλου, 1999; Walkey, 1991). Είναι δυνατόν οι σοβαρές φυλές του ιού της τριστέζας να ανιχνεύονται με ειδικούς αντιορρούς, ενώ πιο ήπιες φυλές να μη μπορούν να ανιχνευτούν. Ο διαφορετικός τρόπος μετάδοσης των φυλών της τριστέζας από τα έντομα-φορείς επηρεάζει την επιδημιολογία της ασθένειας και τους τρόπους αντιμετώπισης της. Για παράδειγμα, η αφίδα *Toxoptera citricida* μεταδίδει κυρίως σοβαρές φυλές του ιού της τριστέζας που προκαλούν βοθρίωση (Garnsey and Lee, 1988; Bar-Joseph *et al.*, 1989).

Έτσι, ο χαρακτηρισμός των φυλών σε μια χώρα είναι σημαντικός για την επιδημιολογία και αντιμετώπιση της ασθένειας.

Ο ιός της τριστέζας προκαλεί στα εσπεριδοειδή τις τρεις πιο κάτω ασθένειες που έχουν άμεση σχέση με την φυλή του ιού:

- α) Παρακμή (Quick decline) σε ορισμένα είδη εσπεριδοειδών, όπως πορτοκαλιά και μανταρινιά εμβολιασμένα σε νεραντζιά
- β) Βοθρίωση του ξύλου (stem pitting) σε δένδρα γκρέϊπφρουτ, πόμελο, πορτοκαλιάς κ.ά.

γ) Ίκτερο των σποροφύτων (seedlings yellows) σε δενδρύλλια νεραντζιάς, λεμονιάς, και γκρέϊπφρουτ στο θερμοκήπιο (Roistacher and Moreno, 1992 Garnsey and Lee, 1988; Bar-Joseph *et al.*, 1989).

Βιολογικός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεζας

Ο βιολογικός χαρακτηρισμός των απομονώσεων του ιού της τριστεζας συνίσταται στη μετάδοση της κάθε απομόνωσης του ιού σε 5 φυτά δείκτες που όταν μολυνθούν εκδηλώνουν συγκεκριμένα συμπτώματα (Πίνακας 3.1). Τα συμπτώματα αυτά έχουν σχέση με την εκδήλωση των τριών συνδρόμων που προκαλεί ο ιός της τριστεζας της παρακμής, της βοθρίωσης του ξύλου και του ίκτερου των σποροφύτων (Εικόνα 3.1).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για καθορισμό της βιολογικής δραστηριότητας μιας συγκεκριμένης απομόνωσης του ιού της τριστεζας και επιτρέπει την σύγκριση των βιολογικών χαρακτηριστικών των διαφόρων απομονώσεων του ιού που προέρχονται από τις διάφορες περιοχές (Garnsey *et al.*, 1987; Garnsey *et al.*, 2005).

Πίνακας 3.1. Συμπτώματα που εμφανίζονται στα φυτά δείκτες που χρησιμοποιούνται για βιολογικό χαρακτηρισμό του ιού της τριστεζας

	Φυτό δείκτης	Συμπτώματα που εμφανίζονται
1	Μεξικανική λιμεττία	Διαφάνεια των νευρώσεων των φύλλων, ελαφρά συστροφή της άνω επιφάνειας του ελάσματος των φύλλων (καρούλιασμα), νανισμός και βοθρίωση. (Εικόνες, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4)
2	Πορτοκαλιά Washington navel εμβολιασμένη σε Κιτρομηλιά	Νανισμός, Χλώρωση, Παρακμή
3	Κιτρομηλιά	Ίκτερος (Εικόνα 3.1), Νανισμός
4	Πορτοκαλιά Madam Vinous	Νανισμός, Βοθρίωση του ξύλου (Εικόνα 2.4)
5	Γκρέϊπφρουτ	Βοθρίωση του ξύλου (Εικόνα 2.4)



Εικόνα 3.1. Συμπτώματα ίκτερου (seedlings yellow) σε κιτρομηλιά
(<http://idtools.org/id/citrus/diseases/factsheet.php?name=Tristeza>)

Τα φυτά δείκτες (Πίνακας 3.1) εμβολιάζονται με κομμάτι φλοιού του προς εξέταση δένδρου μεγέθους 2x1 cm (Kyriakou and Polycarpou 1989; Roistacher, 1991). Συνήθως γίνονται 2-3 τυφλοί εμβολιασμοί για κάθε φυτό σε τομή σχήματος T ή πλάγιου H (Εικόνα 2.5). Τα φυτά παρακολουθούνται για εκδήλωση συμπτωμάτων. Ακολούθως οι απομονώσεις κατατάσσονται σε κατηγορίες ανάλογα με την εκδήλωση των συμπτωμάτων που εμφανίζονται στα 5 φυτά δείκτες.

Στους Πίνακες 3.2 και 3.3 που ακολουθούν, οι οποίοι παρουσιάζονται στις εργασίες των Lee *et al.* 1994 και Garnsey *et al.*, 2005, φαίνεται ο χαρακτηρισμός και η κατάταξη μιας απομόνωσης του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών ανάλογα με τα συμπτώματα που προκαλεί στα 5 φυτά δείκτες.

Πίνακας 3.2. Κατηγορίες απομονώσεων του ιού της τριστεύζας των εσπεριδοειδών με βιολογικό χαρακτηρισμό (Lee *et al.* 1994).

Βιότυπος Ιού	Μεξικανική Λιμεττία (ΔΝ/ΚΦ/ΒΟΘ)	Πορτ/Κιτρ Παρακμή	Κιτρομηλιά Ικτερος	Γκρέιφρουτ Βοθρίωση	Πορτοκαλιά Βοθρίωση
Ο	-	-	-	-	-
I	+	-	-	-	-
II	+	+	-	-	-
III	+	+	+	-	-
IV	+	+	+	+	-
V	+	+	+	-	+
VI	+	-	+	+	-
VII	+	-	-	+	+
VIII	+	-	-	+	-
IX	+	-	-	-	+
X	+	+	+	+	+

Πίνακας 3.3. Κατηγορίες απομονώσεων του ιού της τριστεύζας των εσπεριδοειδών με βιολογικό χαρακτηρισμό (Garnsey *et al.*, 2005)

Βιότυπος Ιού	Μεξικανική Λιμεττία (ΔΝ/ΚΦ/ΒΟΘ)	Πορτ./Κιτρ. (Παρακμή)	Κιτρομηλιά (Ικτερος)	Γκρέιφρουτ (Βοθρίωση)	Πορτοκαλιά (Βοθρίωση)
0	0	0	0	0	0
1	X	0	0	0	0
2	X	X	0	0	0
3	X	X	X	0	0
4	X	X	X	X	0
5	X	X	X	X	X
6	X	X	X	0	X
7	X	X	0	X	X
8	X	0	0	X	X
9	X	X	0	X	0
10	X	0	0	X	0

Παρατηρούμε ότι οι Πίνακες 3.2 και 3.3, είναι παρόμοιοι και παρουσιάζουν την εμφάνιση συμπτωμάτων στα 5 διαφορετικά φυτά δείκτες. Στην πρώτη γραμμή (0) και στους δύο πίνακες όπου κανένα φυτό δεν εμφανίζει συμπτώματα κατατάσσονται οι πολύ ήπιες φυλές του ιού της τριστέζας. Στην γραμμή 1 (Πιν. 3.2) και I (Πιν. 3.3) παρουσιάζονται συμπτώματα μόνο στη Μεξικανική Λιμεττία (ML) κατατάσσονται οι ήπιες φυλές. Στην γραμμή 2 (Πιν. 3.2) και II (Πιν. 3.3) όπου παρουσιάζονται συμπτώματα στη Μεξικανική Λιμεττία (ML) και στην Πορτοκαλιά που είναι εμβολιασμένη σε κιτρομηλιά κατατάσσονται οι μετρίως σοβαρές φυλές. Στην γραμμή 3 (Πιν. 3.2) και III (Πιν. 3.3), όπου παρουσιάζονται συμπτώματα στην Μεξικανική Λιμεττία (ML), στην Πορτοκαλιά που είναι εμβολιασμένη σε κιτρομηλιά και ίκτερος στην κιτρομηλιά, κατατάσσονται οι σοβαρές φυλές. Στις υπόλοιπες γραμμές και στους δύο Πίνακες όπου παρουσιάζονται συμπτώματα βοθρίωσης του ξύλου στην πορτοκαλιά ή/και στο γκρέιπφρουτ κατατάσσονται οι σοβαρές φυλές του ιού.

Ο χαρακτηρισμός των φυλών κατά την παρούσα εργασία βασίστηκε στην εκδήλωση συμπτωμάτων που προκαλούνται σε 5 φυτά δείκτες και στην κατάταξη τους σε φυλογενετικές ομάδες με βάση τον Πίνακα 3.3, στον μοριακό χαρακτηρισμό τους (Κεφάλαιο 5) και στην ορολογική αντίδραση τους.

Κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός πενήντα απομονώσεων του ιού της τριστέζας από όλη την Κύπρο (Καπαρή-Ησαΐα κ.ά., 2005) ώστε να καθοριστεί μέσω του χαρακτηρισμού τους η σοβαρότητα της ασθένειας και να υπάρξει δυνατότητα επιλογής ή δημιουργίας ήπιων απομονώσεων (Protective isolates) και χρήση τους σε πειράματα σταυροειδούς προστασίας.

3.3. Υλικά και Μέθοδοι

3.3.1. Συλλογή απομονώσεων του ιού της τριστεζας

Διεξήχθη επισκόπηση σε φυτείες εσπεριδοειδών από όλη την Κύπρο προσβεβλημένες με τριστεζα και επιλέγησαν 50 δένδρα προσβεβλημένα με τριστεζα τα οποία ελέγχθηκαν με την ορολογική μέθοδο ELISA και παρουσίαζαν στο χωράφι σοβαρά συμπτώματα, ήπια συμπτώματα αλλά και χωρίς εμφανή συμπτώματα της ασθένειας.

3.3.2. Βιολογικός χαρακτηρισμός των 50 απομονώσεων

Υλικό των 50 αυτών δένδρων χρησιμοποιήθηκε για τεχνητή μόλυνση με εμβολιασμό μέρους του φλοιού του κάθε δένδρου (Roistacher, 1991) στα πέντε φυτά δείκτες στο θερμοκήπιο (Πίνακας 3.1). Τα δενδρύλλια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ηλικίας 9-15 μηνών (Roistacher 1991; Ochoa *et al.*, 1993; Garnsey *et al.*, 1995; Rocha-Pena *et al.*, 1995; Sambade *et al.*, 2002; Mooney *et al.*, 2007).

Πειραματικό Σχέδιο: Πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο με 3 επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Τρία δενδρύλλια από κάθε είδος παρέμειναν υγιή και χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες. Ακολούθησε καταγραφή των συμπτωμάτων 2, 6, 12 και 24 μήνες μετά την μόλυνση.

3.3. Ορολογικός έλεγχος απομονώσεων του ιού της τριστεζας

Χρησιμοποιήθηκε η ορολογική μέθοδος ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) για όλες τις απομονώσεις που επιλέγηκαν ώστε να διαπιστωθεί η σοβαρότητα των απομονώσεων με βάση την ένταση της αντίδρασης των στην δοκιμή ELISA (Clark and Adams, 1977; Bar-Joseph *et al.* 1979; Garnsey and Cambra 1991; Bar-Joseph and Hadjinicolis, 1994; Cambra *et al.*, 2002; Κατής κ.ά. 2001). Οι δειγματοληψίες έγιναν 3, 6, 12 και 24 μήνες μετά τις μολύνσεις και χρησιμοποιήθηκε υλικό από νεαρά φύλλα κορυφής των φυτών δεικτών ML. Οι μετρήσεις έγιναν μία ώρα μετά την προσθήκη της φωσφορικής παρα-νιτροφαινόλης και σαν σημείο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η πιο ψηλή τιμή των μαρτύρων που ήταν ML προσβεβλημένα με CTV που παρουσίασαν

σοβαρά συμπτώματα στο θερμοκήπιο και ψηλές τιμές στην αντίδραση των στην δοκιμή ELISA. Η μέθοδος ELISA περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.

3.4. Αποτελέσματα

3.4.1. Συλλογή απομονώσεων του ιού της τριστέζας

Οι απομονώσεις που συνελέγησαν, η κωδική τους ονομασία, η γεωγραφική τους προέλευση, τα φυτά ξενιστές καθώς και τα συμπτώματα που παρουσίαζαν στο χωράφι αναφέρονται στον Πίνακα 3.4 που ακολουθεί.

Οι 50 απομονώσεις προέρχονται από τις 5 επαρχίες της Κύπρου όπου καλλιεργούνται τα εσπεριδοειδή. Από την επαρχία Αμμοχώστου, όπου τα περισσότερα δένδρα είναι μεγάλης ηλικίας, συνελέγηκαν 7 απομονώσεις. Από την επαρχία Λεμεσού, όπου βρίσκονται οι περισσότερες εμπορικές φυτείες και τα μεγάλα αγροκτήματα όπως του Λανίτη, του Φασουρίου κ.α., συνελέγηκαν 18 απομονώσεις. Από την επαρχία Λάρνακας, στην οποία περιλαμβάνεται και η ορεινή περιοχή Αρακαπά όπου καλλιεργείται η ομώνυμη ντόπια ποικιλία μανταρινιάς, επιλέγηκαν 10 απομονώσεις. Από την επαρχία Λευκωσίας επιλέγηκαν 7 απομονώσεις και από την επαρχία Πάφου 8.

Δένδρα με σοβαρά συμπτώματα βοθρίωσης και παρακμής εντοπίστηκαν στην επαρχία Αμμοχώστου, στην Ξυλοτύμπου και στο Φασούρι. Στις υπόλοιπες περιοχές της Κύπρου εντοπίστηκαν δένδρα χωρίς εμφανή συμπτώματα.

Πίνακας 3.4. Γεωγραφική προέλευση, ξενιστές και έτος συλλογής των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

	Κωδικός	Περιοχή	Επαρχία	Είδος/Ποικιλία	Συμπτώματα
1	CY ARI-1	Αυγόρου	Αμμόχωστος	<i>Γκρέιπφρουτ</i>	<i>Παρακμη</i>
2	CY ARI-2	Ξυλοτύμπου	Λάρνακας	<i>Eureca lemon</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
3	CY ARI-3	Βρυσούλλες	Αμμόχωστος	<i>Γκρέιπφρουτ</i>	<i>Παρακμη</i>
4	CY ARI-4	Φασούρι	Λεμεσός	<i>Βαλέντσια</i>	<i>Παρακμη</i>
5	CY ARI-5	Ξυλοτύμπου	Λάρνακα	<i>Κλεμεντίνη</i>	<i>βοθριωση</i>
6	CY ARI-6	Ξυλοτύμπου	Λάρνακα	<i>Κλεμεντίνη</i>	<i>βοθριωση</i>
7	CY ARI-7	Πόλις Χρυσοχούς	Πάφος	<i>Sweetie γκρ</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
8	CY ARI-8	Πόλις Χρυσοχούς	Πάφος	<i>Ortanique</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
9	CY ARI-9	Βρυσούλλες	Αμμόχωστος	<i>Γκρέιπφρουτ</i>	<i>Παρακμη</i>
10	CY ARI-10	Τραχόνι	Λεμεσός	<i>Star Ruby</i>	<i>χωρις συμπτ.</i>
11	CY ARI-11	Φασούρι	Λεμεσός	<i>Βαλέντσια</i>	<i>παρακμη/βοθριωση</i>
12	CY ARI-12	Αυγόρου	Αμμόχωστος	<i>Γκρέιπφρουτ</i>	<i>παρακμη/βοθριωση</i>
13	CY ARI-13	Αυγόρου	Αμμόχωστος	<i>Βαλέντσια Σοβ.</i>	<i>παρακμη/βοθριωση</i>
14	CY ARI-14	Φασούρι	Λεμεσός	<i>Βαλέντσια 1</i>	<i>Παρακμη</i>
15	CY ARI-15	Φασούρι	Λεμεσός	<i>Βαλέντσια 2</i>	<i>Παρακμη</i>
16	CY ARI-16	Φασούρι	Λεμεσός	<i>Βαλέντσια 5</i>	<i>Παρακμη</i>
17	CY ARI-17	Φασούρι	Λεμεσός	<i>Βαλέντσια 6</i>	<i>Παρακμη</i>
18	CY ARI-18	Φασούρι	Λεμεσός	<i>Βαλέντσια 7</i>	<i>Παρακμη</i>
19	CY ARI-19	Φασούρι	Λεμεσός	<i>Βαλέντσια 9</i>	<i>Παρακμη</i>
20	CY ARI-20	Φασούρι	Λεμεσός	<i>Μαντόρα</i>	<i>Νανισμος</i>
21	CY ARI-21	Κολόσσι	Λεμεσός	<i>Μανταρινιά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
22	CY ARI-22	Κολόσσι	Λεμεσός	<i>Μαντόρα</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
23	CY ARI-23	Κολόσσι	Λεμεσός	<i>Μαντόρα</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
24	CY ARI-24	Περιστερώνα	Λευκωσία	<i>Βαλεντσια</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
25	CY ARI-25	Αυγόρου	Αμμόχωστος	<i>Περγαμοντ</i>	<i>Παρακμη</i>
26	CY ARI-26	Σκουλλη	Πάφος	<i>Sweetie γκρ</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
27	CY ARI-27	Μοσφιλωτή	Λάρνακα	<i>Κλεμεντίνη</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
28	CY ARI-28	Μοσφιλωτή	Λάρνακα	<i>Κλεμεντίνη</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
29	CY ARI-29	Μοσφιλωτή	Λάρνακα	<i>Μαντ.Αρακαπά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
30	CY ARI-30	Αρακαπάς	Λάρνακα	<i>Σιεκέρικο</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
31	CY ARI-31	Αρακαπάς	Λάρνακα	<i>Μαντ.Αρακαπά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
32	CY ARI-32	Αρακαπάς	Λάρνακα	<i>Κλεμεντίνη</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
33	CY ARI-33	Αστρομερίτης	Λευκωσία	<i>Βαλέντσια</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
34	CY ARI-34	Αστρομερίτης	Λευκωσία	<i>Βαλέντσια</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
35	CY ARI-35	Αστρομερίτης	Λευκωσία	<i>Βαλέντσια</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
36	CY ARI-36	Ύψωνας Λεμεσός	Λεμεσός	<i>Μαντόρα</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
37	CY ARI-37	Κάτω Πάφος	Πάφος	<i>Κιτρομηλιά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
38	CY ARI-38	Πέγεια	Πάφος	<i>Πορτοκαλιά</i>	<i>Παρακμή</i>
39	CY ARI-39	Πέγεια	Πάφος	<i>Πορτοκαλιά</i>	<i>Παρακμή</i>
40	CY ARI-40	Παρεκκλησιά	Λεμεσός	<i>Πορτοκαλιά</i>	<i>Παρακμή</i>
41	CY ARI-41	Παρεκκλησιά	Λεμεσός	<i>Μανταρινιά</i>	<i>Παρακμή</i>
42	CY ARI-42	Πύργος	Λεμεσός	<i>Πορτοκαλιά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
43	CY ARI-43	Πύργος	Λεμεσός	<i>Πορτοκαλιά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
44	CY ARI-44	Καμάρες	Λάρνακα	<i>Πορτοκαλιά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
45	CY ARI-45	Καϊμακλί	Λευκωσία	<i>Κιτρομηλιά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
46	CY ARI-46	Στρόβολος	Λευκωσία	<i>Κιτρομηλιά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
47	CY ARI-47	Μαντριά	Πάφος	<i>Μανταρινιά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
48	CY ARI-48	Λέμπα	Πάφος	<i>Πορτοκαλιά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
49	CY ARI-49	Κουτραφάς	Λευκωσία	<i>Πορτοκαλιά</i>	<i>χωρις συμπτώματα</i>
50	CY ARI-50	Βρυσούλλες	Αμμόχωστος	<i>Γιαφτικη</i>	<i>Παρακμη</i>

3.4.1. Βιολογικός χαρακτηρισμός των 50 απομονώσεων του ιού της τριστεύζας

Εγινε καταγραφή στο θερμοκήπιο των συμπτωμάτων 2, 6, 12 και 24 μήνες μετά την μόλυνση. Στους Πίνακες 3.5, 3.6, 3.7 και 3.8 παρουσιάζονται τα συμπτώματα που καταγράφηκαν στους 2, 6, 12 και 24 μήνες, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 3.9 παρουσιάζονται τα συμπτώματα που καταγράφηκαν συνολικά κατά την διάρκεια των 24 μηνών.

Δύο μήνες μετά την μόλυνση καταγράφηκαν συμπτώματα διαφάνειας των νευρώσεων και καρουλιάσματος των φύλλων σε δενδρύλλια ML που είχαν μολυνθεί με τις απομονώσεις CYARI 5, CYARI 6, CYARI 11 και CYARI 12, ενώ στα δενδρύλλια ML που μολύνθηκαν με τις απομονώσεις CYARI 13, CYARI 14 και CYARI 18 καταγράφηκαν μόνο συμπτώματα διαφάνειας των νευρώσεων των φύλλων. Τα συμπτώματα αυτά εντοπίστηκαν στα νεαρά φύλλα των δενδρυλλίων (Πίνακας 3.5).

Έξι μήνες μετά την μόλυνση με τις 50 απομονώσεις σχεδόν όλα τα δενδρύλλια ML, με εξαίρεση τα δενδρύλλια ML που είχαν μολυνθεί με τις απομονώσεις CYARI 7 και CYARI 26, παρουσίασαν συμπτώματα διαφάνειας των νευρώσεων και καρουλιάσματος των φύλλων (Πίνακας 3.6). Ο ιός όμως ανιχνεύτηκε σε όλα τα δενδρύλλια με την ορολογική μέθοδο ELISA.

Δώδεκα μήνες μετά την μόλυνση καταγράφηκαν συμπτώματα διαφάνειας των νευρώσεων και καρουλιάσματος των φύλλων σχεδόν σε όλα τα δενδρύλλια ML εκτός αυτά που είχαν μολυνθεί με τις απομονώσεις CYARI 7 και CYARI 26 καθώς και τις CYARI 5 και CYARI 6. Εικοσιένα δενδρύλλια ML παρουσίασαν νανισμό σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (Πίνακας 3.7).

Εικοσιτέσσερις μήνες μετά την μόλυνση δεν καταγράφηκαν συμπτώματα διαφάνειας των νευρώσεων και καρουλιάσματος των φύλλων στα δενδρύλλια ML. Μερικά δενδρύλλια παρουσίασαν νανισμό, ενώ βοθρίωση του ξύλου καταγράφηκε σε 3 απομονώσεις εμβολιασμένες σε MV, σε 5 απομονώσεις εμβολιασμένες σε γκρέιπφρουτ, σε 5 απομονώσεις εμβολιασμένες σε Navel/κιτρομηλιά και 10 απομονώσεις εμβολιασμένες σε ML (Πίνακας 3.8 και Σχήματα 3.1-3.5).

Πίνακας 3.5. Συμπτώματα στα φυτά δείκτες 2 μήνες μετά την μόλυνση

	Κωδικός	Mexican Lime				Navel/Κίτρομ		Κίτρομηλια		Γκρειφορουτ		Madam V.	
		ΔΝ	ΚΦ	ΒΟΘ	NAN	ΒΟΘ	NAN	ΧΛ	NAN	NAN	ΒΟΘ	ΒΟΘ	NAN
1	CY ARI-1												
2	CY ARI-2												
3	CY ARI-3												
4	CY ARI-4												
5	CY ARI-5	X	X										
6	CY ARI-6	X	X										
7	CY ARI-7												
8	CY ARI-8												
9	CY ARI-9												
10	CY ARI-10												
11	CY ARI-11	X	X										
12	CY ARI-12	X	X										
13	CY ARI-13	X											
14	CY ARI-14	X											
15	CY ARI-15												
16	CY ARI-16												
17	CY ARI-17												
18	CY ARI-18	X											
19	CY ARI-19												
20	CY ARI-20												
21	CY ARI-21												
22	CY ARI-22												
23	CY ARI-23												
24	CY ARI-24												
25	CY ARI-25												
26	CY ARI-26												
27	CY ARI-27												
28	CY ARI-28												
29	CY ARI-29												
30	CY ARI-30												
31	CY ARI-31												
32	CY ARI-32												
33	CY ARI-33												
34	CY ARI-34												
35	CY ARI-35												
36	CY ARI-36												
37	CY ARI-37												
38	CY ARI-38												
39	CY ARI-39												
40	CY ARI-40												
41	CY ARI-41												
42	CY ARI-42												
43	CY ARI-43												
44	CY ARI-44												
45	CY ARI-45												
46	CY ARI-46												
47	CY ARI-47												
48	CY ARI-48												
49	CY ARI-49												
50	CY ARI-50												
51	Μάρτυρας												

ΔΝ=Διαφάνεια νευρώσεων, ΚΦ=Καρουλιασμα φύλλου, ΒΟΘ=Βοθρίωση ξύλου,

NAN=Νανισμός, ΧΛ=Χλώρωση

Πίνακας 3.6. Συμπτώματα στα φυτά δείκτες 6 μήνες μετά την μόλυνση

	Κωδικός	Mexican Lime				Navel/Κίτρ		Κιτρομηλία		Γκρειπφρουτ		Madam V.	
		ΔΝ	ΚΦ	ΒΟΘ	NAN	ΒΟΘ	NAN	ΧΛ	NAN	NAN	ΒΟΘ	ΒΟΘ	NAN
1	CY ARI-1	X	X										
2	CY ARI-2	X	X										
3	CY ARI-3	X	X										
4	CY ARI-4	X	X										
5	CY ARI-5	X	X										
6	CY ARI-6	X	X										
7	CY ARI-7												
8	CY ARI-8	X	X										
9	CY ARI-9	X	X										
10	CY ARI-10	X	X										
11	CY ARI-11	X	X										
12	CY ARI-12	X	X										
13	CY ARI-13	X	X										
14	CY ARI-14	X	X										
15	CY ARI-15	X	X										
16	CY ARI-16	X	X										
17	CY ARI-17	X	X										
18	CY ARI-18	X	X										
19	CY ARI-19	X	X										
20	CY ARI-20	X	X										
21	CY ARI-21	X	X										
22	CY ARI-22	X	X										
23	CY ARI-23	X	X										
24	CY ARI-24	X	X										
25	CY ARI-25	X	X										
26	CY ARI-26												
27	CY ARI-27	X	X										
28	CY ARI-28	X	X										
29	CY ARI-29	X	X										
30	CY ARI-30	X	X										
31	CY ARI-31	X	X										
32	CY ARI-32	X	X										
33	CY ARI-33	X	X										
34	CY ARI-34	X	X										
35	CY ARI-35	X	X										
36	CY ARI-36	X	X										
37	CY ARI-37	X	X										
38	CY ARI-38	X	X										
39	CY ARI-39	X	X										
40	CY ARI-40	X	X										
41	CY ARI-41	X	X										
42	CY ARI-42	X	X										
43	CY ARI-43	X	X										
44	CY ARI-44	X	X										
45	CY ARI-45	X	X										
46	CY ARI-46	X	X										
47	CY ARI-47	X	X										
48	CY ARI-48	X	X										
49	CY ARI-49	X	X										
50	CY ARI-50	X	X										
51	Μάρτυρας												

ΔΝ=Διαφάνεια νευρώσεων, ΚΦ=Καρουλιασμα φύλλου, ΒΟΘ=Βοθρίωση ξύλου,

NAN=Νανισμός, ΧΛ=Χλώρωση

Πίνακας 3. 7. Συμπτώματα στα φυτά δείκτες 12 μήνες μετά την μόλυνση

	Κωδικός	Mexican Lime				Navel/Κιτρ		Κιτρομηλία		Γκρειπφρουτ		Madam V.	
		ΔΝ	ΚΦ	ΒΟΘ	NAN	ΒΟΘ	NAN	ΧΛ	NAN	NAN	ΒΟΘ	ΒΟΘ	NAN
1	CY ARI-1	X	X		X								
2	CY ARI-2	X	X										
3	CY ARI-3	X	X		X								
4	CY ARI-4	X	X		X								
5	CY ARI-5												
6	CY ARI-6												
7	CY ARI-7												
8	CY ARI-8	X	X										
9	CY ARI-9	X	X		X								
10	CY ARI-10	X	X										
11	CY ARI-11	X	X		X								
12	CY ARI-12	X	X		X								
13	CY ARI-13	X	X		X								
14	CY ARI-14	X	X		X								
15	CY ARI-15	X	X		X								
16	CY ARI-16	X	X		X								
17	CY ARI-17	X	X		X								
18	CY ARI-18	X	X		X								
19	CY ARI-19	X	X		X								
20	CY ARI-20	X	X										
21	CY ARI-21	X	X		X								
22	CY ARI-22	X	X										
23	CY ARI-23	X	X		X								
24	CY ARI-24	X	X										
25	CY ARI-25	X	X		X								
26	CY ARI-26												
27	CY ARI-27	X	X										
28	CY ARI-28	X	X										
29	CY ARI-29	X	X										
30	CY ARI-30	X	X										
31	CY ARI-31	X	X										
32	CY ARI-32	X	X										
33	CY ARI-33	X	X										
34	CY ARI-34	X	X										
35	CY ARI-35	X	X										
36	CY ARI-36	X	X										
37	CY ARI-37	X	X										
38	CY ARI-38	X	X		X								
39	CY ARI-39	X	X										
40	CY ARI-40	X	X										
41	CY ARI-41	X	X										
42	CY ARI-42	X	X										
43	CY ARI-43	X	X										
44	CY ARI-44	X	X										
45	CY ARI-45	X	X		X								
46	CY ARI-46	X	X		X								
47	CY ARI-47	X	X		X								
48	CY ARI-48	X	X		X								
49	CY ARI-49	X	X										
50	CY ARI-50	X	X										
51	Μάρτυρας												

ΔΝ=Διαφάνεια νευρώσεων, ΚΦ=Καρουλιασμα φύλλου, ΒΟΘ=Βοθρίωση ξύλου,

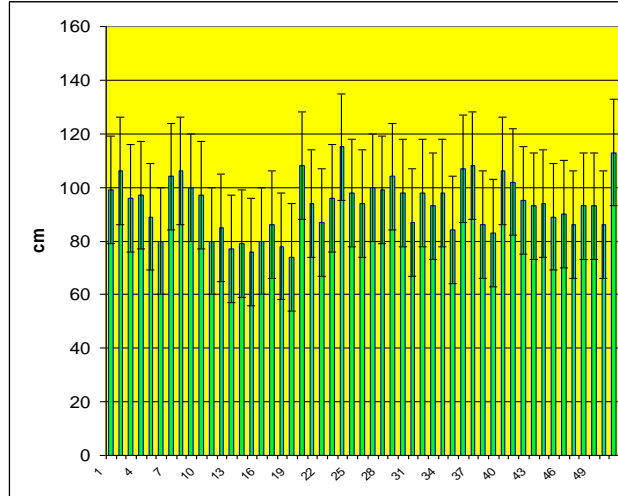
NAN=Νανισμός, ΧΛ=Χλώρωση

Πίνακας 3. 8. Συμπτώματα στα φυτά δείκτες 24 μήνες μετά την μόλυνση

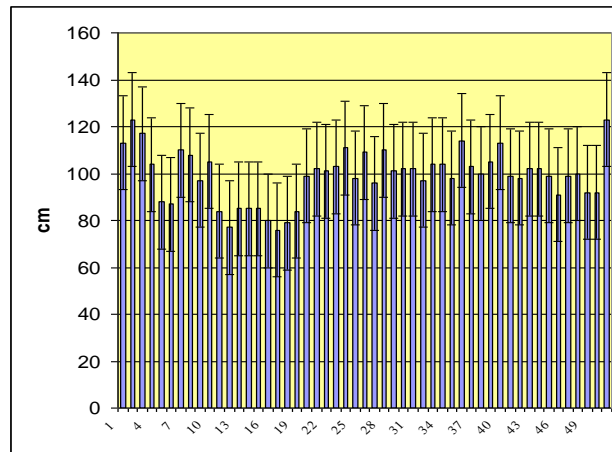
	Κωδικός	Mexican Lime				Navel/Κιτρομ		Κιτρομηλια		Γκρειπφρουτ		Madam V.	
		ΔΝ	ΚΦ	ΒΟΘ	NAN	ΒΟΘ	NAN	ΧΛ	NAN	NAN	ΒΟΘ	ΒΟΘ	NAN
1	CY ARI-1				X								
2	CY ARI-2												
3	CY ARI-3			X	X								X
4	CY ARI-4			X	X								X
5	CY ARI-5			X	X	X			X	X	X	X	X
6	CY ARI-6			X	X	X	X			X	X	X	X
7	CY ARI-7												
8	CY ARI-8												
9	CY ARI-9			X	X								
10	CY ARI-10												
11	CY ARI-11			X	X	X	X			X	X		X
12	CY ARI-12			X	X	X				X	X	X	X
13	CY ARI-13			X	X	X	X		X	X	X		X
14	CY ARI-14			X	X		X						X
15	CY ARI-15			X	X		X						X
16	CY ARI-16			X	X		X						X
17	CY ARI-17			X	X								X
18	CY ARI-18			X	X		X						X
19	CY ARI-19			X	X		X						X
20	CY ARI-20			X									
21	CY ARI-21				X								
22	CY ARI-22												
23	CY ARI-23				X								
24	CY ARI-24												
25	CY ARI-25				X								
26	CY ARI-26												
27	CY ARI-27												
28	CY ARI-28												
29	CY ARI-29												
30	CY ARI-30												
31	CY ARI-31												
32	CY ARI-32												
33	CY ARI-33												
34	CY ARI-34												
35	CY ARI-35												
36	CY ARI-36												
37	CY ARI-37												
38	CY ARI-38			X	X								
39	CY ARI-39			X	X		X						
40	CY ARI-40			X	X								
41	CY ARI-41			X	X								
42	CY ARI-42												
43	CY ARI-43												
44	CY ARI-44												
45	CY ARI-45				X								
46	CY ARI-46				X								
47	CY ARI-47				X								
48	CY ARI-48				X								
49	CY ARI-49												
50	CY ARI-50			X	X								
51	Μάρτυρας												

ΔΝ=Διαφάνεια νευρώσεων, ΚΦ=Καρουλιασμα φύλλου, ΒΟΘ=Βοθρίωση ξύλου,

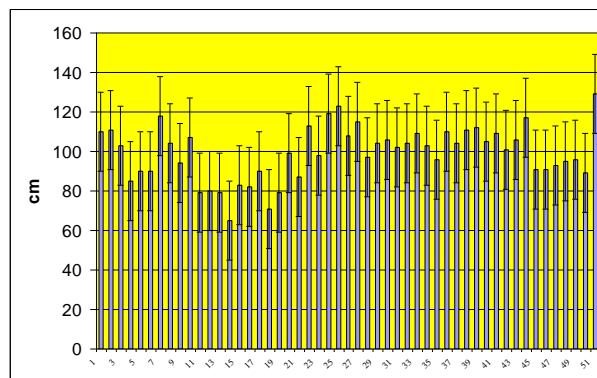
NAN=Νανισμός, ΧΛ=Χλώρωση



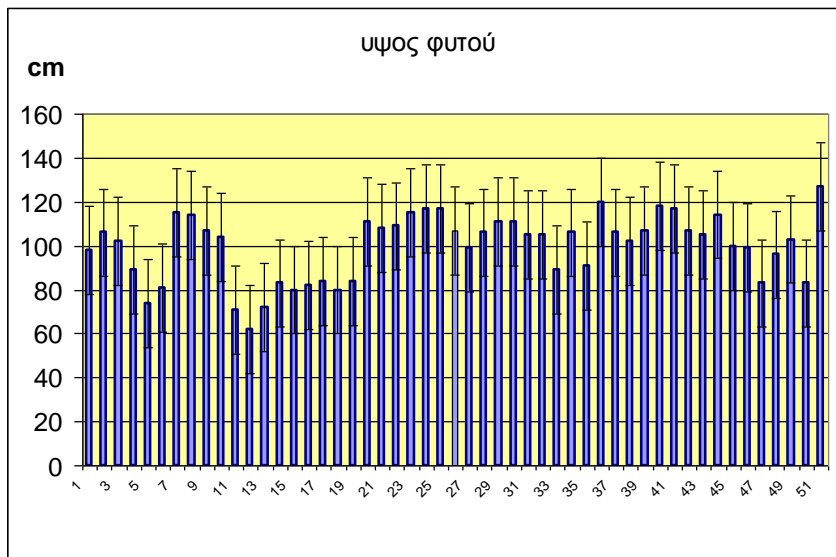
Σχήμα 3.1. Ύψος 50 φυτών δεικτών Navel σε κιτρομηλιά εμβολιασμένων με τις 50 απομονώσεις του ιού της τριστέζας 24 μήνες μετά την μόλυνση (51 μάρτυρας).



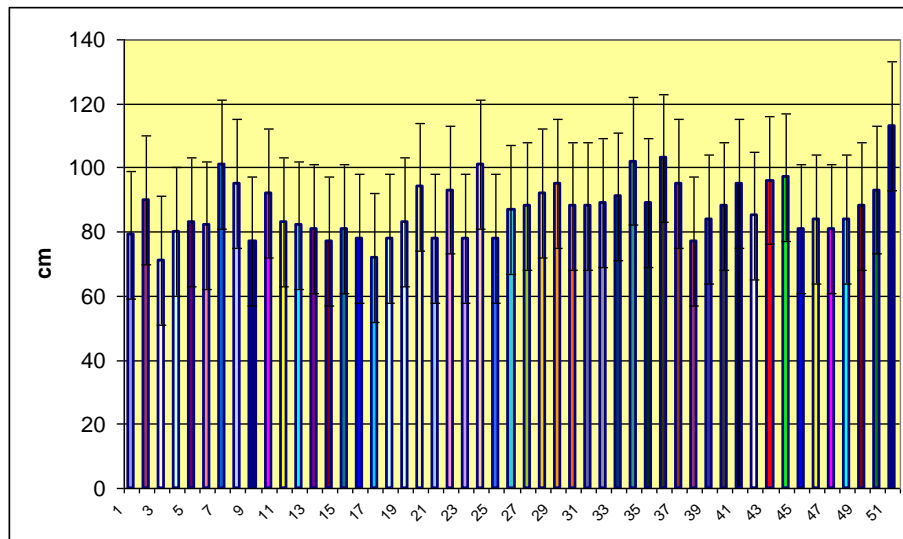
Σχήμα 3.2. Ύψος 50 φυτών δεικτών κιτρομηλιάς εμβολιασμένων με τις 50 απομονώσεις του ιού της τριστέζας 24 μήνες μετά την μόλυνση (51 μάρτυρας).



Σχήμα 3.3. Ύψος 50 φυτών δεικτών γκρέιπφρουτ εμβολιασμένων με τις 50 απομονώσεις του ιού της τριστέζας 24 μήνες μετά την μόλυνση (51 μάρτυρας).



Σχήμα 3.4. Ύψος 50 φυτών δεικτών *Madam Vinous* εμβολιασμένων με τις 50 απομονώσεις του ιού της τριστεύζας 24 μήνες μετά την μόλυνση (51 μάρτυρας).



Σχήμα 3.5. Ύψος 50 φυτών δεικτών *Mexican Lime* εμβολιασμένων με τις 50 απομονώσεις του ιού της τριστεύζας 24 μήνες μετά την μόλυνση (51 μάρτυρας).

Πίνακας 3. 9. Συμπτώματα στα φυτά δείκτες που παρουσιάστηκαν συνολικά

	Κωδικός	Mexican Lime				Navel/Κιτρομ		Κιτρομηλια		Γκρειφρουτ		Madam V.	
		ΔΝ	ΚΦ	ΒΟΘ	NAN	ΒΟΘ	NAN	ΧΛ	NAN	NAN	ΒΟΘ	ΒΟΘ	NAN
1	CY ARI-1	X	X		X								
2	CY ARI-2	X	X										
3	CY ARI-3	X	X	X	X								X
4	CY ARI-4	X	X	X	X		X						X
5	CY ARI-5	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
6	CY ARI-6	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
7	CY ARI-7												
8	CY ARI-8	X	X										
9	CY ARI-9	X	X	X	X								
10	CY ARI-10	X	X										
11	CY ARI-11	X	X	X	X	X	X			X	X		X
12	CY ARI-12	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
13	CY ARI-13	X	X	X	X	X	X		X	X	X		X
14	CY ARI-14	X	X	X	X		X						X
15	CY ARI-15	X	X	X	X		X						X
16	CY ARI-16	X	X	X	X		X						X
17	CY ARI-17	X	X	X	X		X						X
18	CY ARI-18	X	X	X	X		X						X
19	CY ARI-19	X	X	X	X		X						X
20	CY ARI-20	X	X	X									
21	CY ARI-21	X	X		X								
22	CY ARI-22	X	X										
23	CY ARI-23	X	X		X								
24	CY ARI-24	X	X										
25	CY ARI-25	X	X		X								
26	CY ARI-26												
27	CY ARI-27	X	X										
28	CY ARI-28	X	X										
29	CY ARI-29	X	X										
30	CY ARI-30	X	X										
31	CY ARI-31	X	X										
32	CY ARI-32	X	X										
33	CY ARI-33	X	X										
34	CY ARI-34	X	X										
35	CY ARI-35	X	X										
36	CY ARI-36	X	X										
37	CY ARI-37	X	X										
38	CY ARI-38	X	X	X	X		X						X
39	CY ARI-39	X	X	X	X		X						X
40	CY ARI-40	X	X	X	X		X						X
41	CY ARI-41	X	X	X	X		X						X
42	CY ARI-42	X	X										
43	CY ARI-43	X	X										
44	CY ARI-44	X	X										
45	CY ARI-45	X	X		X		X						
46	CY ARI-46	X	X		X		X						
47	CY ARI-47	X	X		X		X						
48	CY ARI-48	X	X		X		X						
49	CY ARI-49	X	X										
50	CY ARI-50	X	X	X			X						
51	Μάρτυρας												

ΔΝ=Διαφάνεια νευρώσεων, ΚΦ=Καρουλιασμα φύλλου, ΒΟΘ=Βοθρίωση ξύλου,

NAN=Νανισμός, ΧΛ=Χλώρωση

Πίνακας 3. 10. Ένταση Συμπτωμάτων στα φυτά δείκτες

	Κωδικός	ΔΝ/ΚΦ/ΒΟΘ/ΝΑΝ	Ικτερος	Βοθρίωση Ξύλου		
		ML	Κιτρομηλιά	Ναβελ	Γκρειπ	Madam Vinous
1	CY ARI-1	2	0	0	0	0
2	CY ARI-2	1	0	0	0	0
3	CY ARI-3	3	0	0	0	0
4	CY ARI-4	3	0	0	0	0
5	CY ARI-5	3	0	3	3	3
6	CY ARI-6	3	0	3	3	3
7	CY ARI-7	0	0	0	0	0
8	CY ARI-8	1	0	0	0	0
9	CY ARI-9	2	0	0	0	0
10	CY ARI-10	1	0	0	0	0
11	CY ARI-11	3	0	3	3	0
12	CY ARI-12	3	0	3	3	3
13	CY ARI-13	3	0	3	3	0
14	CY ARI-14	3	0	0	0	0
15	CY ARI-15	3	0	0	0	0
16	CY ARI-16	3	0	0	0	0
17	CY ARI-17	3	0	0	0	0
18	CY ARI-18	3	0	0	0	0
19	CY ARI-19	3	0	0	0	0
20	CY ARI-20	2	0	0	0	0
21	CY ARI-21	2	0	0	0	0
22	CY ARI-22	1	0	0	0	0
23	CY ARI-23	2	0	0	0	0
24	CY ARI-24	1	0	0	0	0
25	CY ARI-25	2	0	0	0	0
26	CY ARI-26	0	0	0	0	0
27	CY ARI-27	1	0	0	0	0
28	CY ARI-28	1	0	0	0	0
29	CY ARI-29	1	0	0	0	0
30	CY ARI-30	1	0	0	0	0
31	CY ARI-31	1	0	0	0	0
32	CY ARI-32	1	0	0	0	0
33	CY ARI-33	1	0	0	0	0
34	CY ARI-34	1	0	0	0	0
35	CY ARI-35	1	0	0	0	0
36	CY ARI-36	1	0	0	0	0
37	CY ARI-37	1	0	0	0	0
38	CY ARI-38	3	0	0	0	0
39	CY ARI-39	3	0	0	0	0
40	CY ARI-40	3	0	0	0	0
41	CY ARI-41	3	0	0	0	0
42	CY ARI-42	1	0	0	0	0
43	CY ARI-43	1	0	0	0	0
44	CY ARI-44	1	0	0	0	0
45	CY ARI-45	2	0	0	0	0
46	CY ARI-46	2	0	0	0	0
47	CY ARI-47	2	0	0	0	0
48	CY ARI-48	2	0	0	0	0
49	CY ARI-49	1	0	0	0	0
50	CY ARI-50	3	0	0	0	0
51	Μάρτυρας	0	0	0	0	0

Κλίμακα 0-3

0 καθόλου συμπτώματα, **3** πολύ σοβαρά

Πίνακας 3.11. Μέσοι όροι Ορολογικής αντίδρασης των απομονώσεων 24 μήνες μετά την μόλυνση

	Κωδικός	Ένταση ELISA
1	CY ARI-1	0,483
2	CY ARI-2	0,656
3	CY ARI-3	0,513
4	CY ARI-4	0,852
5	CY ARI-5	1,321
6	CY ARI-6	1,236
7	CY ARI-7	0,165
8	CY ARI-8	0,352
9	CY ARI-9	0,422
10	CY ARI-10	0,468
11	CY ARI-11	1,127
12	CY ARI-12	1,372
13	CY ARI-13	1,436
14	CY ARI-14	0,857
15	CY ARI-15	0,875
16	CY ARI-16	0,799
17	CY ARI-17	0,902
18	CY ARI-18	0,898
19	CY ARI-19	0,775
20	CY ARI-20	0,602
21	CY ARI-21	0,315
22	CY ARI-22	0,422
23	CY ARI-23	0,512
24	CY ARI-24	0,472
25	CY ARI-25	0,353
26	CY ARI-26	0,182
27	CY ARI-27	0,267
28	CY ARI-28	0,489
29	CY ARI-29	0,502
30	CY ARI-30	0,451
31	CY ARI-31	0,601
32	CY ARI-32	0,530
33	CY ARI-33	0,482
34	CY ARI-34	0,495
35	CY ARI-35	0,392
36	CY ARI-36	0,615
37	CY ARI-37	0,359
38	CY ARI-38	0,401
39	CY ARI-39	0,418
40	CY ARI-40	0,491
41	CY ARI-41	0,501
42	CY ARI-42	0,389
43	CY ARI-43	0,472
44	CY ARI-44	0,333
45	CY ARI-45	0,715
46	CY ARI-46	0,832
47	CY ARI-47	0,792
48	CY ARI-48	0,821
49	CY ARI-49	0,401
50	CY ARI-50	0,767
51	Αρνητικός Μαρτυρας	0,020

Πίνακας 3.12. Συνολικά συμπτώματα που παρουσίασαν οι απομονώσεις στις διάφορες φυλογενετικές ομάδες

Φυλογ ομάδα	Αριθμός απομον	Mexican Lime				Navel/Κιτρομ		Κιτρομηλιά		Γκρέιπφρουτ		Mandam V.	
		ΔΝ	ΚΦ	ΒΟΘ	NAN	ΒΟΘ	NAN	ΧΛ	NAN	NAN	ΒΟΘ	ΒΟΘ	NAN
0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	31	31	31	6	7	0	3	0	0	0	0	0	1
2	12	12	12	8	11	0	12	0	0	0	0	0	7
8	3	3	3	3	3	3	3	0	1	3	3	3	3
9	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
10	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
	Σύνολο	48	48	19	23	5	17	0	2	5	5	3	12

Πίνακας 3.13. Αριθμός και ποσοστό % απομονώσεων για τις διάφορες κατηγορίες φυλών

Φυλογενετική ομάδα	Χαρακτηρισμός φυλής	Αριθμός απομονώσεων	Ποσοστό%
0	Πολύ ήπια	2	4
1	Ήπια	27	54
2	Μετρίως Σοβαρή	16	32
3	Σοβαρή	0	0
4	Σοβαρή	0	0
5	Σοβαρή	0	0
6	Σοβαρή	0	0
7	Σοβαρή	0	0
8	Σοβαρή	3	6
9	Σοβαρή	1	2
10	Σοβαρή	1	2
	Σύνολο	50	100

Πίνακας 3.14. Κατάταξη των απομονώσεων τριστέζας σε φυλές

	Κωδικός	Φυλογενετική Ομάδα	Χαρακτηρισμός Φυλής
1	CY ARI-1	1	ήπια
2	CY ARI-2	1	ήπια
3	CY ARI-3	1	ήπια
4	CY ARI-4	2	μετρίως σοβαρή
5	CY ARI-5	8	Σοβαρή
6	CY ARI-6	8	Σοβαρή
7	CY ARI-7	0	πολύ ήπια
8	CY ARI-8	1	Ηπια
9	CY ARI-9	1	Ηπια
10	CY ARI-10	1	Ηπια
11	CY ARI-11	9	Σοβαρή
12	CY ARI-12	8	Σοβαρή
13	CY ARI-13	10	Σοβαρή
14	CY ARI-14	2	μετρίως σοβαρή
15	CY ARI-15	2	μετρίως σοβαρή
16	CY ARI-16	2	μετρίως σοβαρή
17	CY ARI-17	2	μετρίως σοβαρή
18	CY ARI-18	2	μετρίως σοβαρή
19	CY ARI-19	2	μετρίως σοβαρή
20	CY ARI-20	1	Ήπια
21	CY ARI-21	1	Ήπια
22	CY ARI-22	1	Ήπια
23	CY ARI-23	1	Ήπια
24	CY ARI-24	1	πολύ ήπια
25	CY ARI-25	1	Ήπια
26	CY ARI-26	0	Ήπια
27	CY ARI-27	1	Ήπια
28	CY ARI-28	1	Ήπια
29	CY ARI-29	1	Ήπια
30	CY ARI-30	1	Ήπια
31	CY ARI-31	1	Ήπια
32	CY ARI-32	1	Ήπια
33	CY ARI-33	1	Ήπια
34	CY ARI-34	1	Ήπια
35	CY ARI-35	1	Ήπια
36	CY ARI-36	1	Ήπια
37	CY ARI-37	1	Ήπια
38	CY ARI-38	1	μετρίως σοβαρή
39	CY ARI-39	1	μετρίως σοβαρή
40	CY ARI-40	1	μετρίως σοβαρή
41	CY ARI-41	1	μετρίως σοβαρή
42	CY ARI-42	1	Ήπια
43	CY ARI-43	1	Ήπια
44	CY ARI-44	1	Ήπια
45	CY ARI-45	2	μετρίως σοβαρή
46	CY ARI-46	2	μετρίως σοβαρή
47	CY ARI-47	2	μετρίως σοβαρή
48	CY ARI-48	2	μετρίως σοβαρή
49	CY ARI-49	1	Ήπια
50	CY ARI-50	2	μετρίως σοβαρή

3.5. Συζήτηση

Ο ιός της τριστέζας των εσπεριδοειδών προκαλεί τρεις ασθένειες στα εσπεριδοειδή που έχουν σχέση με την σοβαρότητα της φυλής του ιού. Οι σοβαρές φυλές του ιού μπορεί να προκαλέσουν παρακμή συνήθως σε πορτοκαλιές ή μανταρινιές εμβολιασμένες σε κιτρομηλιές, βοθρίωση του ξύλου ή ίκτερο των σποροφύτων. Αντίθετα, οι ήπιες φυλές του ιού δεν προκαλούν συμπτώματα και σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να προστατέψουν το δένδρο μέσω σταυροειδούς προστασίας από μετέπειτα προσβολή από άλλη σοβαρή φυλή του ιού. Έτσι, ο χαρακτηρισμός των φυλών είναι σημαντικός για την επιδημιολογία της ασθένειας και έχει σχέση με τον τρόπο αντιμετώπισης της. Η αντιμετώπιση της τριστέζας μπορεί να γίνει με εκρίζωση των προσβεβλημένων δένδρων και χρήση ελεγμένου πολλαπλασιαστικού υλικού για εγκατάσταση νέων φυτειών στις περιπτώσεις όπου η ασθένεια δεν είναι διαδεδομένη σε ποσοστό μεγαλύτερο του 5%. Στις περιπτώσεις όμως που το ποσοστό προσβολής είναι ψηλό και ενδημεί η αφίδα *Toxoptera citricida*, η οποία μεταδίδει τις σοβαρές φυλές του ιού που προκαλούν βοθρίωση, η ασθένεια δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί μόνο με εκριζώσεις. Στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν οι φυλές που προκαλούν παρακμή σε δένδρα εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά και ο φορέας δεν είναι η *Toxoptera citricida* η ασθένεια μπορεί να αντιμετωπιστεί με χρήση άλλων υποκειμένων εκτός της κιτρομηλιάς όπως τα citranges, το citrumelo, το Volkameriana κ.α. Στις περιπτώσεις όμως όπου ενδημεί η αφίδα *Toxoptera citricida* και υπάρχουν οι φυλές που προκαλούν βοθρίωση, η ασθένεια δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί με αλλαγή των υποκειμένων αφού η βοθρίωση αναπτύσσεται μετά από την προσβολή με τον ιό σε όλα τα υποκείμενα.

Ο βιολογικός χαρακτηρισμός των απομονώσεων του ιού της τριστέζας είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση της ασθένειας σε μια χώρα. Παρά το ότι είναι μια χρονοβόρα διαδικασία με αρκετά ψηλό κόστος, είναι εντούτοις χρήσιμη αφού καταδεικνύει την βιολογική δραστηριότητα μιας απομόνωσης στα πέντε διαφορετικά φυτά δείκτες που αναπτύσσουν συμπτώματα που έχουν σχέση με τη σοβαρότητα της κάθε απομόνωσης. Ένα καλό εργαλείο για χαρακτηρισμό των απομονώσεων είναι σήμερα ο μοριακός χαρακτηρισμός που μπορεί να βασιστεί σε αποτελέσματα από άλλες χώρες. Όμως, ο συνδυασμός του βιολογικού και μοριακού χαρακτηρισμού είναι

σημαντικός για μια χώρα, δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα αποτελέσματα αυτά για μοριακό χαρακτηρισμό και άλλων απομονώσεων έχοντας σαν μοντέλο εκτός από τα διεθνή και τα τοπικά αποτελέσματα.

Ο βιολογικός χαρακτηρισμός των 50 τοπικών απομονώσεων του ιού της τριστεύζας των εσπεριδοειδών, που συνελέγησαν από προσβεβλημένες φυτείες από όλη την Κύπρο, κατέδειξε ότι το ποσοστό των ήπιων φυλών του ιού (58%) υπερτερεί σε σχέση με το ποσοστό των μετρίως σοβαρών (32%) και σοβαρών φυλών (10%). Οι ήπιες φυλές που προκαλούν συμπτώματα μόνο στο ML προκαλούν πολύ μικρές ή και καθόλου ζημιές στις εμπορικές φυτείες και επιπλέον μπορεί να είναι χρήσιμες για προστασία των δένδρων μέσω σταυροειδούς προστασίας από ζημιές που προκαλούν άλλες σοβαρές φυλές του ιού. Οι σοβαρές φυλές του ιού προκαλούν συμπτώματα βοθρίωσης και ικτέρου. Μεταξύ των 50 απομονώσεων καμιά δεν παρουσίασε συμπτώματα ικτέρου, ενώ συμπτώματα βοθρίωσης παρουσίασαν 5 απομονώσεις.

Δύο από τις 50 απομονώσεις, οι CYARI 7 και CYARI 26 από δένδρα Sweetie που προήλθαν από το Ισραήλ, δεν παρουσίασαν κανένα σύμπτωμα στα φυτά δείκτες αλλά αντέδρασαν στην ELISA, είναι πολύ ήπιες και είναι χρήσιμες για πειράματα σταυροειδούς προστασίας. Οι απομονώσεις αυτές είναι παρόμοιες όπως παρουσιάζονται στην εργασία των Yokomi *et al.* 1989, ως προς την μη εκδήλωση συμπτωμάτων στα φυτά δείκτες, με την Galego από την Βραζιλία, τις 27T, MOR4-8, ST και HT από το Ισραήλ, την HM-55 από την Ιαπωνία, την Nartia από την Ν. Αφρική, τις T-300 και T-385 από την Ισπανία, τις T514 και T516 από την Καλιφόρνια και την T30a από την Φλόριδα. Οι δύο αυτές απομονώσεις θα διατηρηθούν στο θερμοκήπιο για μελέτες σταυροειδούς προστασίας.

Οι πιο σοβαρές απομονώσεις είναι οι CYAR5, CYARI 6 από την Ξυλοτύμπου και CYARI12 από την Αυγόρου που προκάλεσαν βοθρίωση στο γκρέιπφρουτ και πορτοκαλιά Madam Vinous. Σοβαρές είναι και οι απομονώσεις CYARI11 και CYARI13 από το Φασούρι Λεμεσού που προκάλεσαν βοθρίωση στο γκρέιπφρουτ. Συμπτώματα βοθρίωσης παρουσίασαν οι απομονώσεις 7K6, Bolton, SR4 Bedlane από

την Νότιο Αφρική (Yokomi *et al.* 1989). Στην Κύπρο ο ιός της τριστέζας ανιχνεύτηκε το 1966 στο φυτώριο Αμμοχώστου σε 27 δένδρα που προήλθαν από εμβόλια που εισήχθηκαν στην Κύπρο από την Νότιο Αφρική το 1929 (Papasolomontos and Economides, 1968). Οι περιοχές Ξυλοτύμπου και Αυγόρου απ' όπου συνελέγησαν οι απομονώσεις που χαρακτηρίστηκαν σαν σοβαρές είναι κοντά στην Αμμόχωστο. Έτσι, υπάρχει η πιθανότητα τα δένδρα αυτά που παρουσίασαν παρόμοια συμπτώματα με τις απομονώσεις από την Νότιο Αφρική να προέρχονται από το πολλαπλασιαστικό υλικό που εισήχθη στην Κύπρο το 1929.

Μεγάλο ποσοστό ήπιων απομονώσεων του ιού της τριστέζας στην Κύπρο συναντώνται στις επαρχίες Λευκωσίας, Λάρνακας, Πάφου και μέρος της επαρχίας Λεμεσού. Στις αντίστοιχες επαρχίες το ποσοστό προσβολής με τριστέζα, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα παγκύπριας επισκόπησης (Καπαρή κ.α., 2005) ήταν χαμηλό τόσο μεταξύ των δένδρων όσο και μεταξύ των φυτειών. Επιπρόσθετα, τα δένδρα δεν παρουσίασαν σοβαρά συμπτώματα με εξαίρεση νεαρή φυτεία στην επαρχία Λευκωσίας που παρουσίασε συμπτώματα παρακμής σε δένδρα κοκκινόσαρκων γκρέιπφρουτ εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά και η οποία εκριζώθηκε το 1996. Στην επαρχία Αμμοχώστου, όπου συναντώνται οι σοβαρές απομονώσεις του ιού, τα περισσότερα δένδρα είναι μεγάλης ηλικίας και ανήκουν στις ποικιλίες πορτοκαλιάς Γιαφίτικη και στις Βαλέντσια καθώς και λευκόσαρκα γκρέιπφρουτ. Μερικά παρουσίαζαν συμπτώματα παρακμής και βοθρίωσης στο χωράφι ενώ άλλα ήταν ασυμπτωματικά. Φυτείες με πολύ σοβαρά συμπτώματα εκριζώθηκαν ενώ παράλληλα απαγορεύτηκε δια νόμου η διακίνηση πολλαπλασιαστικού υλικού από την επαρχία αυτή σε άλλες επαρχίες. Στην περιοχή Φασουρίου της επαρχίας Λεμεσού, όπου υπάρχουν τα μεγάλα αγροκτήματα Φασουρίου και Λανίτη, παρουσιάζονται κυρίως μετρίως σοβαρές αλλά και σοβαρές απομονώσεις του ιού. Σε παρόμοιες εργασίες χαρακτηρισμού απομονώσεων, όπως στην περίπτωση της Αυστραλίας, όπου είναι διαδεδομένη η *Toxoptera citricida*, υπερτερούν οι σοβαρές φυλές του ιού (Broadbent *et al.* 1996). Στην περίπτωση της Καλιφόρνιας όπου δεν υπάρχει η *Toxoptera citricida*, υπερτερούν οι ήπιες φυλές του ιού (Yokomi *et al.*, 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΤΕΖΑΣ ΤΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ *IN VITRO*

4.1. Περίληψη

Η ανίχνευση του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών γίνεται με βιολογικό τρόπο με χρήση του φυτοδείκτη της μεξικανικής λιμεττίας, στο θερμοκήπιο. Η μέθοδος αυτή είναι χρονοβόρα, αφού απαιτείται περίοδος 2-12 μηνών για διάγνωση της ασθένειας. Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος για επιτάχυνση της ανίχνευσης του ιού *in vitro* στο εργαστήριο, η οποία αποτελεί συνδυασμό της βιολογικής διαγνωστικής μεθόδου χρήσης του φυτοδείκτη της μεξικανικής λιμεττίας και της μεθόδου του μικροεμβολιασμού σε σωλήνα. Μετά τον μικροεμβολιασμό μικρομοσχευμάτων λιμεττίας με μολυσμένο με τριστεζα φλοιό και φύτευση τους *in vitro*, τα φύλλα των νέων μικροφυτών παρουσίασαν συμπτώματα διαφάνειας των νευρώσεων και καρουλιάσματος σε διάστημα 25-30 ημερών. Φυτεύτηκαν επίσης μικρομοσχεύματα λιμεττίας *in vitro* που προέρχονταν από μολυσμένα δενδρύλλια και παρουσίασαν συμπτώματα σε 20-30 μέρες, αμέσως μετά την έκπτυξη των νέων φύλλων.

Ο βιολογικός *in vitro* χαρακτηρισμός 4 απομονώσεων του ιού της τριστεζας της σοβαρής CYARI 5, της μετρίως σοβαρής CYARI 11, της ήπιας CYARI 24 και της πολύ ήπιας CYARI 7 έγινε με καλλιέργεια μολυσμένων μικρομοσχευμάτων μεξικανικής λιμεττίας σε θρεπτικό υπόστρωμα *in vitro*. Στα μικρόφυτα, που ήταν προσβεβλημένα με τη σοβαρή και την μετρίως σοβαρή απομόνωση του ιού της τριστεζας, καταγράφηκε μείωση του μήκους του νέου βλαστού, του μήκους του βλαστού και φύλλου, του βάρους του βλαστού και των φύλλων και του αριθμού και μεγέθους των φύλλων σε σχέση με τα υγιή. Στα μικρόφυτα που ήταν προσβεβλημένα με την ήπια και την πολύ ήπια απομόνωση του ιού της τριστεζας δεν καταγράφηκαν διαφορές αναφορικά με τα πιο πάνω σε σχέση με τα υγιή. Σχεδόν όλα τα μικρόφυτα εμφάνισαν συμπτώματα διαφάνειας των νευρώσεων εκτός από τα μικρόφυτα που ήταν προσβεβλημένα με την απομόνωση CYARI 7.

4.2. Εισαγωγή

Η ανίχνευση του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών μπορεί να γίνει με εργαστηριακές μεθόδους όπως την ορολογική μέθοδο ELISA (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Garnsey *et al.*, 1993) καθώς και με μοριακές μεθόδους όπως η RT-PCR (Pappu *et al.*, 1993; Nolasco *et al.*, 2002). Οι μέθοδοι αυτές όμως αν και ταχύτερες δεν μπορούν να αντικαταστήσουν απόλυτα την βιολογική μέθοδο με την χρήση του φυτοδείκτη της μεξικανικής λιμεττίας, αφού η εφαρμογή της μεθόδου αυτής είναι απαραίτητη στα προγράμματα πιστοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού με βάση τον «Περί παραγωγής και Εμπορίας φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού νόμο» της Κυπριακής Δημοκρατίας του 2006 που βασίζεται σε κανονισμούς και Οδηγίες της ΕΕ καθώς και κανονισμούς Οργανισμών όπως η ΕΡΡΟ, 2005.

Η ανίχνευση του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών με βιολογικό τρόπο με την χρήση του φυτοδείκτη της μεξικανικής λιμεττίας, Mexican Lime (*Citrus aurantifolia*, *Christm. Swingle*) γίνεται στο θερμοκήπιο και κατά τη μέθοδο αυτή η λιμεττία εμβολιάζεται με φλοιό από το δένδρο που εξετάζεται με τομή τύπου T. Αριθμός δενδρυλλίων λιμεττίας παραμένουν υγιή και χρησιμοποιούνται σαν μάρτυρες (Kyriakou and Polycarrou 1989; Roistacher, 1991). Με την είσοδο του στον φυτοδείκτη ο ιός πολλαπλασιάζεται με ταχύτητα, γεγονός που επιτρέπει την ομοιόμορφη κατανομή του στο φυτό και την διάγνωση του. Εξάλλου, η λιμεττία χρησιμοποιείται για βιολογικό χαρακτηρισμό των απομονώσεων του ιού.

Οι λιμεττίες που είναι προσβεβλημένες με τριστέζα παρουσιάζουν τα εξής συμπτώματα:

- A) Διαφάνεια των νευρώσεων των φύλλων (Εικόνα 2.1),
- B) ελαφρά συστροφή της άνω επιφάνειας του ελάσματος των φύλλων (Εικόνα 2.2),
- Γ) νανισμό (Εικόνα 2.3) και
- Δ) βοθρίωση του ξύλου (Εικόνα 2.4).

Τα συμπτώματα αυτά είναι σοβαρότερα όταν η λιμεττία προσβληθεί με σοβαρή φυλή του ιού και ηπιότερα όταν προσβληθεί με ήπια.

Η μέθοδος αυτή είναι χρονοβόρα αφού απαιτούνται συνήθως 2-12 μήνες για την διάγνωση του ιού μετά την μόλυνση του δενδρυλλίου της λιμεττίας καθώς και 9-12 μήνες για φύτευση και ανάπτυξη του δενδρυλλίου.

Μια παρεμφερής μέθοδος για διάγνωση του ιού με χρήση μοσχευμάτων λιμεττίας αναπτύχθηκε από τους Pratt and Jorgensen, 1972. Κατά την μέθοδο αυτή μοσχεύματα λιμεττίας μολύνθηκαν με τον ιό με εμβολιασμό και τα μοσχεύματα φυτεύτηκαν ώστε να ριζοβολήσουν. Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 30 -69 μέρες μετά τον εμβολιασμό.

Αργότερα, το 2005, μια παρόμοια μέθοδος για διάγνωση του ιού με χρήση μοσχευμάτων λιμεττίας αναπτύχθηκε από τον El Sayed στα πλαίσια διατριβής στο CIHEAM-IAMB Ιταλίας. Κατά την μέθοδο αυτή μοσχεύματα λιμεττίας μολύνθηκαν με τον ιό με εμβολιασμό και εμβολιάστηκαν σε άλλα μοσχεύματα *Volkameriana lemon* και *Etrog citron* τα οποία έχουν πιο εύκολη ριζοβολία σε σχέση με την λιμεττία (D' Onghia *et al.*, 2009). Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 20-30 μέρες μετά τον εμβολιασμό.

Για την βιολογική διάγνωση των ιοειδών των εσπεριδοειδών εκτός θερμοκηπίου αναπτύχθηκε το 2007 μια *in vitro* μέθοδος που αποτελεί συνδυασμό της βιολογικής διαγνωστικής μεθόδου με χρήση του φυτοδείκτη *Etrog citron* και της μεθόδου του μικροεμβολιασμού σε σωλήνα (Karari-Isaia *et al.*, 2007).

Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ώστε να διαπιστωθεί η δυνατότητα διάγνωσης του ιού της τριστεζας *in vitro* με χρήση μοσχευμάτων του φυτού δείκτη της Μεξικανικής λιμεττίας. Ο βιολογικός χαρακτηρισμός των απομονώσεων του ιού της τριστεζας που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3 συνίσταται στη μετάδοση μιας απομόνωσης του ιού της τριστεζας σε 5 διαφορετικά είδη δενδρυλλίων δεικτών. Συγκεκριμένα, το προς εξέταση υλικό εμβολιάζεται στην Μεξικανική λιμεττία (ML), σε πορτοκαλιά εμβολιασμένη σε κιτρομηλιά, στην κιτρομηλιά, στη πορτοκαλιά και στο γκρέιπφρουτ, που όταν μολυνθούν εκδηλώνουν συγκεκριμένα συμπτώματα (Πίνακας 3.1). Τα συμπτώματα αυτά έχουν σχέση με την εκδήλωση των τριών συνδρόμων που προκαλεί ο ιός της τριστεζας, δηλαδή της παρακαμής, της βοθρίωσης του ξύλου και του ίκτερου των σποροφύτων (Garnsey *et al.*, 1987 και 2005).

Σε εργασία των Ghorbel *et al.*, 1998, διεξήχθη βιολογικός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεζας *in vitro* με χρήση μικρομοσχευμάτων από 5 φυτά δείκτες μολυσμένων με απομονώσεις της τριστεζας. Ο φυτοδείκτης της μεξικανικής

λιμεττίας φάνηκε να είναι ο πιο ευαίσθητος δείκτης ως προς την διαφοροποίηση των απομονώσεων σε σχέση με την μορφογένεση των μικροφυτών *in vitro* (Duran-Vila *et al.*, 1989; Duran-Vila *et al.*, 1991; Ghorbel *et al.*, 1998; Kapari-Isaia *et al.*, 2007).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο φυτοδείκτης της μεξικανικής λιμεττίας για μελέτη της μορφογένεσης μικροφυτών *in vitro* που παρήχθησαν από 4 απομονώσεις προσβεβλημένες με την σοβαρή τοπική απομόνωση του ιού της τριστέζας CYARI 5, την μετρίως σοβαρή απομόνωση CYARI 11, την ήπια απομόνωση CYARI 24 και τη πολύ ήπια CYARI 7.

4.3. Υλικά και μέθοδοι

4.3.1. Μητρικά δενδρύλλια προσβεβλημένα με τον ιό της τριστέζας

Επιλέγηκαν 4 δενδρύλλια Μεξικανικής λιμεττίας που ήταν προσβεβλημένα με την σοβαρή απομόνωση του ιού της τριστέζας CYARI 5, την μετρίως σοβαρή ARI 11, την ήπια CYARI 24 και την πολύ ήπια CYARI 7. Οι απομονώσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν βιολογικά (κεφάλαιο 3) και μοριακά (κεφάλαιο 5).

Οι απομονώσεις αυτές μεταδόθηκαν σε υγιή φυτά Μεξικανικής λιμεττίας με αφίδες *Aphis gossypii* ώστε να αποκλειστεί η ύπαρξη άλλων ιών στο υλικό που χρησιμοποιήθηκε σαν μητρικό, καθώς η αφίδα μεταδίδει μόνο την τριστέζα και όχι άλλους ιούς ή ιοειδή που πιθανόν να υπάρχουν στο μητρικό υλικό των απομονώσεων (Broadbent *et al.*, 1996; Kyriakou *et al.*, 1993). Παρά το ότι η ύπαρξη ιοειδών ή άλλων ιών στο μητρικό υλικό των απομονώσεων που χαρακτηρίζονται βιολογικά στο θερμοκήπιο δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα (Garnsey *et al.*, 2005), προτιμήθηκε κατά την παρούσα εργασία όπου τα πειράματα διεξήχθησαν *in vitro* να χρησιμοποιηθεί υλικό προσβεβλημένο μόνο με τριστέζα.

Αρχικά τοποθετήθηκαν οι αφίδες σε υγιή δενδρύλλια πορτοκαλιάς που εγκλείστηκαν σε μικρούς εντομοστεγείς κλωβούς σε θάλαμο με σταθερά θερμοκρασία 22 °C. Τα

δενδρύλλια κλαδεύτηκαν πριν την εγκατάσταση των αφίδων ώστε να έχουν νέα βλάστηση που ευνοεί την εγκατάστασή τους και είναι επιθυμητή από τα έντομα.

Αργότερα 5-10 αφίδες τοποθετήθηκαν στα φύλλα ενός προβλεβλημένου με απομόνωση τριστέζας δενδρυλλίου ώστε να τραφούν για 24 ώρες και να προσλάβουν τον ιό. Ακολούθως οι ιοφόρες αφίδες τοποθετήθηκαν πάνω στα φύλλα υγιούς δενδρυλλίου το οποίο είχε κλαδευτεί 15-20 μέρες προηγουμένως ώστε να έχει νέα βλάστηση. Τα δύο δενδρύλλια τοποθετήθηκαν μαζί σε εντομοστεγή κλωβό ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες μετάδοσης. Μετά από περίοδο 48 ωρών τα δενδρύλλια ψεκάστηκαν με αφιδοκτόνο και μεταφέρθηκαν σε άλλο θάλαμο ώστε να πολλαπλασιαστεί ο ιός σ' αυτά. Μετά από ένα και δύο μήνες ελέγχθηκε η ύπαρξη του ιού στα νέα φύλλα με τη μέθοδο ELISA (Roistacher *et al.*, 1988).

4.3.2. Μικροεμβολιασμός *in vitro* για διάγνωση CTV

Μοσχεύματα μεξικανικής λιμεττίας 1.5-2 cm που έφεραν 1-2 οφθαλμούς μολύνθηκαν τεχνητά με την απομόνωση CY ARI 5 του ιού της τριστέζας. Πριν από τον εμβολιασμό τα μοσχεύματα αποστειρώθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης (15%) + Tween 20 (1%) και ξεπλύθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες. Έγιναν τεχνητές μολύνσεις των μοσχευμάτων με εμβολιασμό φλοιού (τυφλοί εμβολιασμοί) από δενδρύλλιο μολυσμένο με τον ιό της τριστέζας. Στο μόσχευμα έγινε τομή σχήματος «H» και εκεί τοποθετήθηκε το εμβόλιο (Εικόνες 2.5, 4.1). Η εργασία αυτή έγινε με τη χρήση στερεομικροσκοπίου υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα "μικροεμβολιασμένα" μοσχεύματα λιμεττίας τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα με άλατα MS, phytagel και σακχαρόζη (A1). Ακολούθως, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (22-25 °C) και φωτοπερίοδο 16 ωρών (Karagi-Isaia *et al.*, 2007).

Αμέσως μετά την έκπτυξη των φύλλων από τα μοσχεύματα λιμεττίας *in vitro* άρχισε η καταγραφή παρατηρήσεων ως προς την εκδήλωση συμπτωμάτων στα μικρόφυτα καθώς και μετρήσεων του μήκους βλαστού και φύλλων, αριθμού φύλλων, βάρους βλαστού και φύλλων 30 μέρες μετά την φύτευση.

Πειραματικό Σχέδιο: Πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο με 20 επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. 20 μοσχεύματα παρέμειναν υγιή για να χρησιμοποιηθούν σαν μάρτυρες.

4.3.3. Μελέτη της επίδρασης θρεπτικών υποστρωμάτων στην ανάπτυξη των μικροφυτών μεξικανικής λιμεττίας *in vitro* προσβεβλημένης με CTV

Δοκιμάστηκε το θρεπτικό υπόστρωμα με άλατα MS (A1) καθώς και δύο άλλα υποστρώματα με στόχο την διερεύνηση της δυνατότητας διαφοροποίησης της ανάπτυξης των μικροφυτών *in vitro*. Τα δύο υποστρώματα περιείχαν τα άλατα MS, αλλά ήταν εμπλουτισμένα με Inositol, 3-Indolebutyric acid, Thiamine.HCl, και Pyridoxine Nicotinic acid (A2) ή N6-Benzyladenine, Benzylaminopurine Thiamine.HCl (A3). Η ακριβής σύσταση των 3 υποστρωμάτων φαίνεται στον Πίνακα 4.1 που ακολουθεί. Διεξήχθη καλλιέργεια μοσχευμάτων μεξικανικής λιμεττίας μολυσμένων με την απομονώση του ιού της τριστεζας CYARI 5. Μοσχεύματα μεξικανικής λιμεττίας μήκους 1.5-2 cm που φέρουν 1-2 οφθαλμούς αποστειρώθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης (15%) + Tween 20 (1%) και ξεπλύθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν τα 3 θρεπτικά υποστρώματα. Ακολούθως, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (22-25 °C) και φωτοπερίοδο 16 ωρών.



Εικόνα 4.1. Μικροεμβολιασμός μοσχεύματος μεξικανικής λιμεττίας με φλοιό μολυσμένο με τον ιό της τριστεζας εσπεριδοειδών *in vitro*.

4.3.4.Βιολογικός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεζας *in vitro*

Διεξήχθη καλλιέργεια μοσχευμάτων μεξικανικής λιμεττίας μολυσμένων με τις 4 διαφορετικές απομονώσεις του ιού της τριστεζας που αναφέρονται πιο πάνω. Μοσχεύματα μεξικανικής λιμεττίας μήκους 1.5-2 cm που έφεραν 1-2 οφθαλμούς αποστειρώθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης (15%) + Tween 20 (1%) και ξεπλύθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα με άλατα Mc Cown, phytigel και σακχαρόζη (Πίνακας 2.1). Ακολούθως, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (22-25 °C) και φωτοπερίοδο 16 ωρών (Duran-Vila *et al.*, 1989; Duran-Vila *et al.*, 1991; Ghorbel *et al.*, 1998; Karari-Isaia *et al.*, 2007).

Αμέσως μετά την έκπτυξη των φύλλων από τα μοσχεύματα μεξικανικής λιμεττίας *in vitro* άρχισε η καταγραφή παρατηρήσεων ως προς την εκδήλωση συμπτωμάτων στα μικρόφυτα και 30 μέρες μετά την φύτευση έγιναν μετρήσεις του μήκους βλαστού και φύλλων, αριθμού φύλλων και βάρους βλαστού και φύλλων.

Πειραματικό Σχέδιο: Πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο με 20 επαναλήψεις για κάθε δοκιμή, ενώ 20 μοσχεύματα παρέμειναν υγιή για να χρησιμοποιηθούν σαν μάρτυρες.

Πίνακας 4.1. Σύσταση των υποστρωμάτων στα οποία φυτεύτηκαν οι βλαστοί της Μεξικανικής λιμεττίας *in vitro*.

Συστατικά	Ποσότητα	Υπόστρωμα		
		A1	A2	A3
KNO ₃	mg	1900	1900	1900
NH ₄ NO ₃	mg	1650	1650	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	mg	440	440	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	mg	370	370	370
KH ₂ PO ₄	mg	170	170	170
MnSO ₄ .H ₂ O	mg	16,9	16,9	16,9
H ₃ BO ₃	mg	6,2	6,2	6,2
KI	mg	0,83	0,83	0,83
ZnSO ₄ .4H ₂ O	mg	8,6	8,6	8,6
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	mg	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	mg	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	mg	0,025	0,025	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	mg	27,85	27,85	27,85
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	mg	37,25	37,25	37,25
Inositol	mg	-	100	-
3-Indolebutyric acid	mg	-	-	0,3
N ⁶ Benzyladenine	mg	-	-	1
Thiamine.HCl	mg	-	0,2	0,4
Pyridoxine	mg	-	1	-
Napthalene acetic acid	mg	-	5	-
Benzylaminopurinre	mg	-	2	-
Nicotinic acid	mg	-	1	-
Sucrose	gr	30	30	30
Phytigel	gr	3	3	3
H ₂ O	lt	1	1	1

4.4. Αποτελέσματα

4.4.1. Μητρικά δενδρύλλια προσβεβλημένα με τον ιό της τριστέζας

Επιλέγηκαν 4 δενδρύλλια Μεξικανικής λιμεττίας που ήταν προσβεβλημένα με τις πιο κάτω τοπικές απομονώσεις του ιού:

- A) Με την σοβαρή απομόνωση CY ARI 5 που προήλθε από δένδρο κλημεντίνης με σοβαρά συμπτώματα βοθρίωσης και παρακμής από την Ξυλοτύμπου,
- B) την μετρίως σοβαρή απομόνωση CY ARI 11 που προήλθε από δένδρο Βαλέντσια με συμπτώματα παρακμής και βοθρίωσης από το Φασούρι Λεμεσού.
- Γ) την ήπια απομόνωση CY ARI 24 που προήλθε από δένδρο βαλέντσια από την Περιστερώνα που δεν παρουσίασε συμπτώματα.
- Δ) την πολύ ήπια απομόνωση CY ARI 7 που προήλθε από δένδρο γκρέιπφρουτ sweetie από την πόλη της Χρυσοχούς που δεν παρουσίασε συμπτώματα.

4.4.2. Μικροεμβολιασμός *in vitro* για διάγνωση CTV

Τα συμπτώματα στα φύλλα των μικροφυτών λιμεττίας που είχαν μολυνθεί με την απομόνωση CYARI 5 εμφανίστηκαν 25-30 μέρες μετά την φύτευση. Μετά την έκπτυξη των νέων φύλλων στα μοσχεύματα λιμεττίας *in vitro* άρχισε να εμφανίζεται διαφάνεια στις νευρώσεις των φύλλων (Εικόνες 4.2, 4.3), ενώ τα νέα φύλλα παρουσίασαν καρούλιασμα. Επίσης, τα μικροφυτά παρουσίασαν γενική καχεξία και νανισμό. Τα μικρομοσχεύματα, που δεν μολύνθηκαν με τριστέζα και χρησιμοποιήθηκαν σαν υγιείς μάρτυρες, δεν παρουσίασαν κανένα σύμπτωμα. Οι μετρήσεις του μήκους βλαστού και φύλλων, αριθμού φύλλων, βάρους βλαστού και φύλλων, που έγιναν 30 μέρες μετά την φύτευση, έδειξαν μείωση του μήκους και βάρους βλαστού και φύλλων σε σχέση με τα υγιή. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των νέων φύλλων ήταν μεγαλύτερος στα προσβεβλημένα μικροφυτά αλλά το μέγεθος των φύλλων ήταν μικρότερο σε σχέση με τα υγιή.

4.4.3. Μελέτη της επίδρασης θρεπτικών υποστρωμάτων στην ανάπτυξη των μικροφυτών μεξικανικής λιμεττίας *in vitro* προσβεβλημένης με CTV

Οι βλαστοί της μεξικανικής λιμεττίας είχαν εκπύξει τα πρώτα φύλλα μια βδομάδα μετά την φύτευση και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα. Η σύσταση των τριών υποστρωμάτων δεν επηρέασε την ανάπτυξη των φύλλων. Η έκπτυξη του κάλλου ήταν ταχύτερη στο υπόστρωμα A2 όπου από την 1η εβδομάδα μετά την φύτευση εκπύχθηκαν οι κάλλοι σε χαμηλό όμως ποσοστό, 66,67% των βλαστών που φυτεύτηκαν. Στο υπόστρωμα A3 η έκπτυξη των κάλλων έγινε 2 βδομάδες μετά την φύτευση και το ποσοστό καλλογένεσης ήταν 93,10%. Στο υπόστρωμα A1 η έκπτυξη των κάλλων έγινε στις 3 βδομάδες μετά την φύτευση με ποσοστό καλλογένεσης 86,36%. Το μήκος των νεοεκπτυχθέντων βλαστών επηρεάστηκε από τα τρία υποστρώματα, αφού παρουσιάστηκε μεγαλύτερη ανάπτυξη στους βλαστούς που φυτεύτηκαν στα υποστρώματα A1 (8,52 cm) και A3 (6,60 cm) σε σχέση με τους βλαστούς που φυτεύτηκαν στο υπόστρωμα A2 (4,60 cm). Το είδος του υποστρώματος επηρέασε και την έκπτυξη ρίζας. Η έκπτυξη ρίζας ήταν η ταχύτερη στο υπόστρωμα A3 όπου από την 4η βδομάδα μετά την φύτευση εκπύχθηκαν οι ρίζες σε ποσοστό 79,31%. Στο υπόστρωμα A1 η έκπτυξη ρίζας έγινε μετά από 5 βδομάδες με ποσοστό 59,09% και στο υπόστρωμα A2 η έκπτυξη ρίζας άρχισε μετά από 6 βδομάδες με ποσοστό 91,76% (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.2. Διαφάνεια νευρώσεων και καρούλιασμα φύλλων σε μικρόφυτα της απομονώσης CYARI 5 του ιού της τριστεύζας των εσπεριδοειδών σε καλλιέργεια *in vitro*



Εικόνα 4.3. Διαφάνεια νευρώσεων και καρούλιασμα φύλλων σε μικρόφυτα της απομονώσης CYARI 5 του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών σε καλλιέργεια *in vitro*



Εικόνα 4.4. Καλλιέργεια και ανάπτυξη μικροφυτών μεξικανικής λιμεττίας *in vitro*

4.4.4. Βιολογικός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστέζας *in vitro*

Είκοσι μέρες μετά την φύτευση των μικρομοσχευμάτων στους σωλήνες καταγράφηκαν συμπτώματα διαφάνειας των νευρώσεων των φύλλων στα μικρόφυτα ML που προέρχονταν από τις απομονώσεις CYARI 5 (σοβαρή), CYARI 11 (μετρίως σοβαρή) και CYARI 24 (ήπια). Είκοσι μέρες μετά την φύτευση των μικρομοσχευμάτων στους σωλήνες καταγράφηκαν συμπτώματα καρουλιάσματος των φύλλων στα μικρόφυτα ML που προέρχονταν από τις απομονώσεις CYARI 5, CYARI 11 (Εικόνα 4.5), CYARI 24 και στο 25% των μικρόφυτων ML που προέρχονταν από την απομόνωση CYARI 7 (πολύ ήπια). Στα μικρόφυτα που προέρχονταν από τις απομονώσεις CYARI 7 και στους υγιείς μάρτυρες δεν παρουσιάστηκαν συμπτώματα διαφάνειας των νευρώσεων. Στα μικρόφυτα που προέρχονταν από τους υγιείς μάρτυρες και στο 75% των μικροφυτών που προέρχονταν από την απομόνωση CYARI 7 δεν παρουσιάστηκαν συμπτώματα καρουλιάσματος των φύλλων (Σχήμα 4.4).

Σε μικρό ποσοστό (3-5%) των μικροφυτών λιμεττίας που ήταν προσβεβλημένα με την σοβαρή απομόνωση CYARI 5 καταγράφηκαν συμπτώματα βοθρίωσης (Εικόνα 4.6) 6-8 μήνες μετά την φύτευση.



Εικόνα 4.5. Διαφάνεια νευρώσεων και καρουλιάσμα σε φύλλο από μικρόφυτο της απομόνωσης CYARI 11 του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών σε καλλιέργεια *in vitro*.

Ο μέσος όρος του μήκους των νέων βλαστών που εκπτύχθηκαν στα μικρόφυτα που προέρχονταν από τις 4 απομονώσεις παρουσίασε διαφορές μεταξύ των απομονώσεων 30 μέρες μετά την φύτευση των μικρομοσχευμάτων *in vitro*. Το μικρότερο μήκος

καταγράφηκε στην σοβαρή απομόνωση CYARI 5 (1,32 cm), και ακολούθως στην μετρίως σοβαρή CYARI 11 (1,40 cm). Ο μέσος όρος του μήκους των νέων βλαστών για τις ήπιες CYARI 24 και CYARI 7 ήταν μεγαλύτερος από τις προηγούμενες 1,59 cm και 1,70 cm, αντίστοιχα, ενώ ο μέσος όρος του μήκους των νέων βλαστών των υγιών μαρτύρων ήταν 1,90 cm (Σχήμα 4.1).



Εικόνα 4.6. Μικρόφυτο λιμεττίας προσβεβλημένο με την σοβαρή απομόνωση CYARI 5 με συμπτώματα βοθρίωσης

Ο μέσος όρος του μήκους των νέων βλαστών και των φύλλων που εκπτύχθηκαν στα μικρόφυτα που προέρχονταν από τις 4 απομονώσεις παρουσίασε διαφορές μεταξύ των απομονώσεων 30 μέρες μετά την φύτευση των μικρομοσχευμάτων *in vitro*. Το μικρότερο μήκος καταγράφηκε στην σοβαρή απομόνωση CYARI 5 (3,20 cm), και ακολούθως στην μετρίως σοβαρή CYARI 11 (4,30 cm). Ο μέσος όρος του μήκους των νέων βλαστών και φύλλων για τις ήπιες CYARI 24 και CYARI 7 ήταν μεγαλύτερος από τις προηγούμενες 4,90 cm και 5,20 cm, αντίστοιχα, ενώ ο μέσος όρος του μήκους των νέων βλαστών και φύλλων των υγιών μαρτύρων ήταν 5,95 cm.

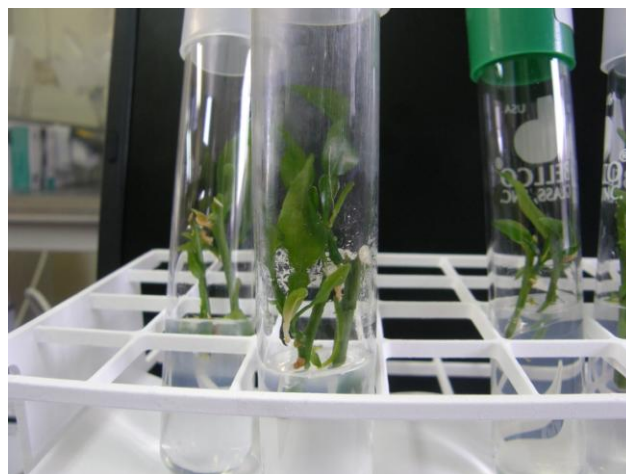
Ο μέσος όρος του βάρους των νέων βλαστών και των φύλλων που εκπτύχθηκαν στα μικρόφυτα που προέρχονταν από τις 4 απομονώσεις παρουσίασε διαφορές μεταξύ των απομονώσεων 30 μέρες μετά την φύτευση των μικρομοσχευμάτων *in vitro*. Το μικρότερο

μήκος καταγράφηκε στην σοβαρή απομόνωση CYARI 5 (0,25 gr), και ακολούθως στην μετρίως σοβαρή CYARI 11 (0,28 gr). Ο μέσος όρος του βάρους των νέων βλαστών και φύλλων για τις ήπιες απομονώσεις CYARI 24 και CYARI 7 ήταν μεγαλύτερος από τις προηγούμενες 0,32 gr και 0,35 gr, αντίστοιχα, ενώ ο μέσος όρος του βάρους των νέων βλαστών και φύλλων των υγιών μαρτύρων ήταν 0,40 gr (Σχήμα 4.2).

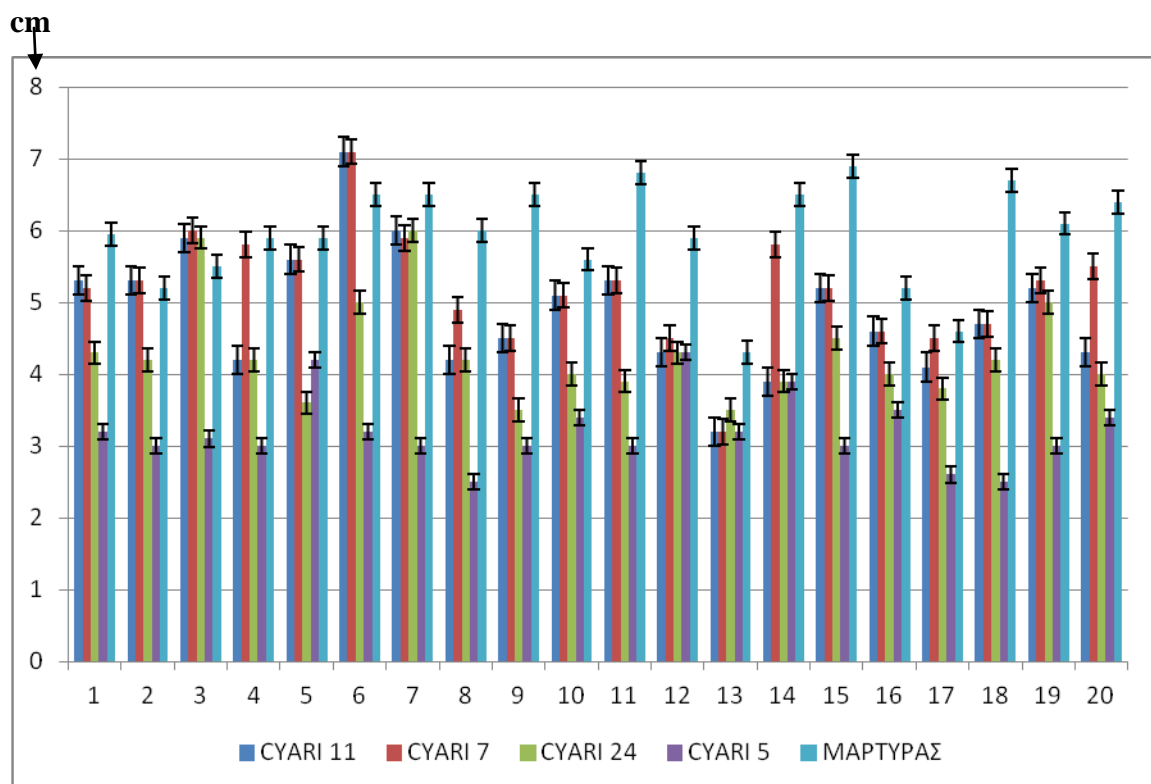
Ο μέσος όρος του αριθμού των φύλλων που εκπτύχθηκαν στα μικρόφυτα που προέρχονταν από τις 4 απομονώσεις παρουσίασε διαφορές μεταξύ των απομονώσεων 30 μέρες μετά την φύτευση των μικρομοσχευμάτων *in vitro*. Ο μεγαλύτερος αριθμός φύλλων καταγράφηκε στην σοβαρή απομόνωση CYARI 5 (6), και ακολούθως στην μετρίως σοβαρή CYARI 11 (4,1). Ο μέσος όρος του μήκους των νέων βλαστών για τις ήπιες απομονώσεις CYARI 24 και CYARI 7 ήταν μικρότερος από τις προηγούμενες 3.2 και 3.1, αντίστοιχα, ενώ ο μέσος όρος του αριθμού φύλλων των υγιών μαρτύρων ήταν τρία (Σχήμα 4.3). Σημειώνεται ότι το μέγεθος των φύλλων στα μικρόφυτα των σοβαρών απομονώσεων που είχαν μεγάλο αριθμό φύλλων ήταν πολύ μικρότερο σε σχέση με το μέγεθος των φύλλων των ήπιων απομονώσεων και των μαρτύρων (Εικόνα 4.7 και 4.8). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων επισυνάπτεται στο Παράρτημα που ακολουθεί.



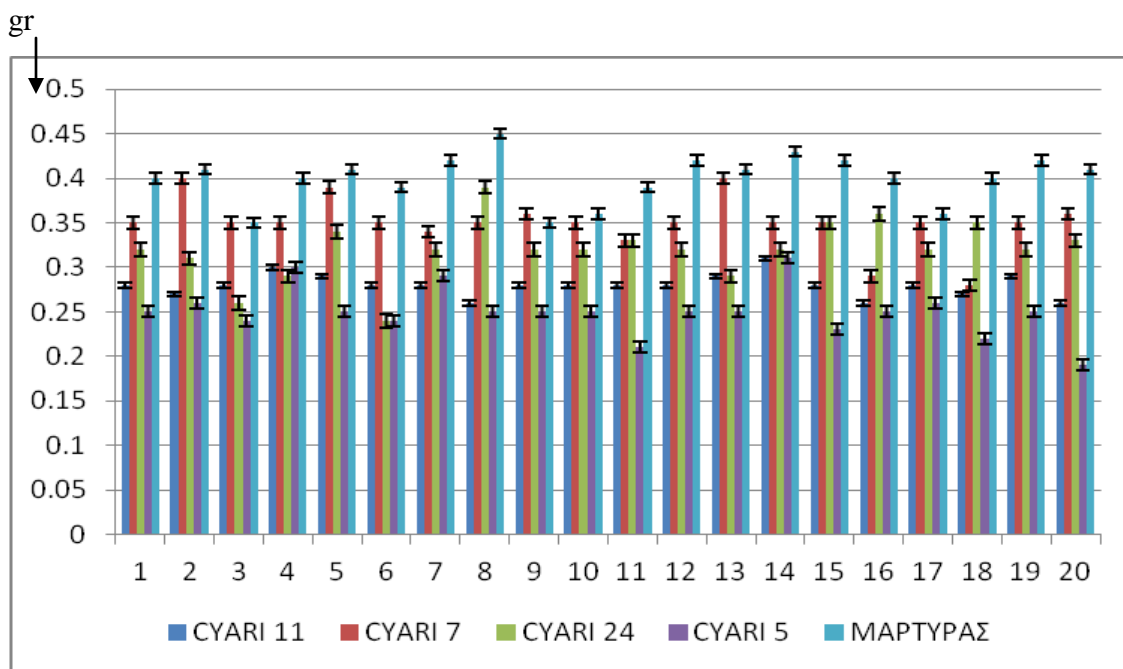
Εικόνα 4.7. Μικροφυλλία σε μικρόφυτα λιμεττίας προσβεβλημένα με την σοβαρή απομόνωση CYARI 5.



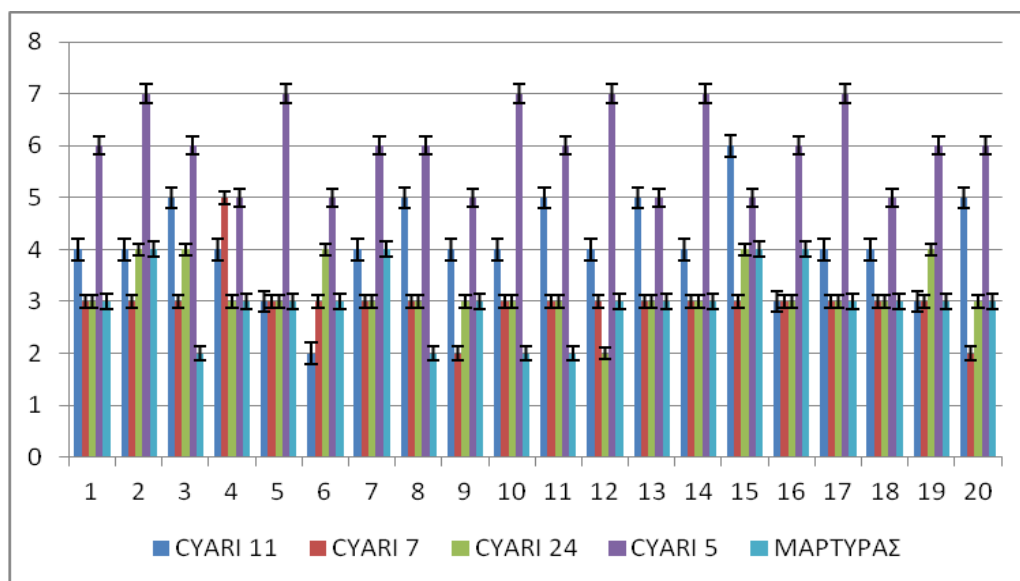
Εικόνα 4.8. Μικροφυλλία σε μικρόφυτα λιμεττίας προσβεβλημένα με την μετρίως σοβαρή απομόνωση CYARI 11 (δεξιά) σε σχέση με τους μάρτυρες (αριστερά).



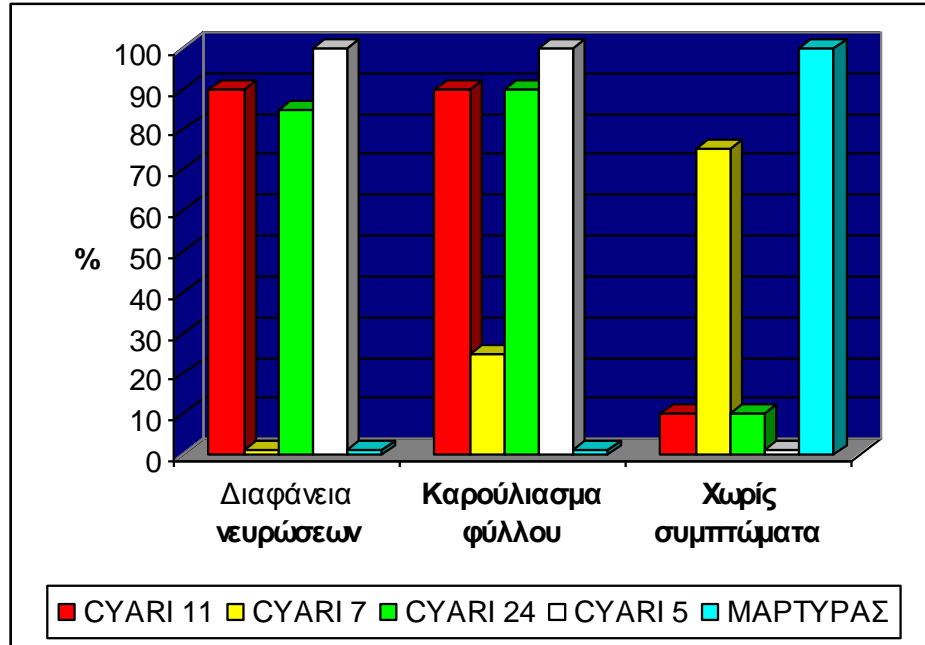
Σχήμα 4.1. Επίδραση των 4 απομονώσεων του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών στο μήκος του νέου βλαστού των μικροφυτών ML σε καλλιέργεια *in vitro*



Σχήμα 4.2. Επίδραση των 4 απομονώσεων του ιού της τριστεύζας των εσπεριδοειδών στο βάρος του νέου βλαστού και φύλλων των μικροφυτών ML σε καλλιέργεια *in vitro*.



Σχήμα 4.3. Επίδραση των 4 απομονώσεων του ιού της τριστεύζας των εσπεριδοειδών στον αριθμό των φύλλων των μικροφυτών ML σε καλλιέργεια *in vitro*.



Σχήμα 4.4. Επίδραση των 4 απομονώσεων του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών στην εμφάνιση συμπτωμάτων στα μικροφυτά σε καλλιέργεια *in vitro*

4.5. Συζήτηση

Η βιολογική διάγνωση του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών είναι απαραίτητη στα προγράμματα πιστοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού με βάση την ευρωπαϊκή και τοπική νομοθεσία. Ο χρόνος που απαιτείται για την διάγνωση του ιού με την γνωστή κλασική μέθοδο των φυτών δεικτών είναι μεγάλος (2-12 μήνες από την στιγμή της μόλυνσης) και η διαδικασία είναι επίπονη και με ψηλό κόστος. Στην ουσία ο χρόνος αυτός είναι πολύ μεγαλύτερος, αφού για να επιτευχθεί η διάγνωση πρέπει να υπάρχουν έτοιμα δενδρύλλια για εμβολιασμό ηλικίας περίπου 9-12 μηνών. Αυτό προϋποθέτει την ανάπτυξη και συντήρηση τους σε θερμοκήπιο, διαδικασία επίσης χρονοβόρα, επίπονη και με ψηλό κόστος (Roistacher, 1991; Kyriakou, 1992). Έτσι, μια νέα μέθοδος που παρέχει ταχεία και αξιόπιστη βιολογική διάγνωση του ιού, όπως αυτή που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι πολύτιμη σε Προγράμματα εξυγίανσης και παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών.

Η επιτυχής διάγνωση της τριστέζας καθώς και άλλων παρεμφερών παθογόνων, είναι απαραίτητη για την παραγωγή, διατήρηση και διάδοση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (Lee, 2000; Navarro *et al.*, 2001), μέτρο που είναι απαραίτητο τόσο για την αντιμετώπιση του ιού της τριστέζας όσο και άλλων ιών και ιοειδών των εσπεριδοειδών. Η ανάγκη για χρήση ελεγμένου υλικού εσπεριδοειδών καθίσταται πιο επιτακτική σε περίπτωση αντικατάστασης του υποκειμένου της νεραντζιάς που χρησιμοποιείται σήμερα στον τόπο μας και θεωρείται ευπαθές στην τριστέζα, με άλλα υποκείμενα ανεκτικά στην τριστέζα αλλά ευπαθή στον εξωκόρτη και άλλα ιοειδή, τα οποία είναι διαδεδομένα στην Κύπρο σε ποσοστό 90% των εσπεριδοειδών (Κυγιάκου, 1992) και μεταδίδονται πολύ εύκολα με μηχανικά μέσα όπως ψαλίδια κλαδέματος κ.α. Υπάρχουν παραδείγματα χωρών που χρησιμοποίησαν υποκείμενα ανεκτικά στην τριστέζα και ευπαθή στα ιοειδή για να αντιμετωπίσουν την ασθένεια αυτή σε συνδυασμό με πολλαπλασιαστικό υλικό μολυσμένο με ιοειδή, με αποτέλεσμα η εσπεριδοκαλλιέργεια να υποστεί μεγαλύτερες ζημιές από τον εξωκόρτη και τα άλλα ιοειδή (Lee, 2000; Navarro *et al.*, 2001; Roistacher, 1995).

Η νέα *in vitro* μέθοδος για επιτάχυνση της ανίχνευσης του ιού της τριστέζας στα εσπεριδοειδή που αναπτύχθηκε κατά την παρούσα μελέτη, και η οποία αποτελεί συνδυασμό της βιολογικής διαγνωστικής μεθόδου χρήσης του φυτοδείκτη της μεξικανικής λιμεττίας και της μεθόδου του μικροεμβολιασμού σε σωλήνα, μπορεί να αντικαταστήσει την κλασική μέθοδο του θερμοκηπίου.

Η *in vitro* μέθοδος μπορεί να αντικαταστήσει και την βιολογική μέθοδο για διάγνωση του ιού της τριστέζας που αναπτύχθηκε από τον El Sayed, 2005, στα πλαίσια διατριβής στο CIHEAM-IAMB Ιταλίας. Κατά την μέθοδο αυτή μοσχεύματα λιμεττίας που μολύνθηκαν με τον ιό με εμβολιασμό εμβολιάστηκαν σε άλλα μοσχεύματα *Volkameriana lemon* και *Etrog citron* (D'Onghia *et al.*, 2009). Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 20-30 μέρες μετά τον εμβολιασμό. Με την παρούσα *in vitro* μέθοδο ή διάγνωση της τριστέζας επιτυγχάνεται επίσης σε 20-30 μέρες.

Η *in vitro* μέθοδος διάγνωσης του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αποτελεί μια ταχεία βιολογική μέθοδο διάγνωσης της τριστέζας. Κυριότερα πλεονεκτήματα της νέας μεθόδου σε σύγκριση με την κλασσική βιολογική μέθοδο διάγνωσης είναι η ταχύτητα διάγνωσης, η οικονομία και η αξιοπιστία. Η ταχύτητα διάγνωσης πιθανόν να έχει σχέση με τον χρόνο που απαιτείται για πολλαπλασιασμό και μετακίνηση του ιού μέσα στην λιμεττία. Κατά την κλασσική μέθοδο διάγνωσης ο ιός της τριστέζας μετακινείται σε μεγαλύτερα φυτά που έχουν μήκος 40-100 cm, ενώ κατά την *in vitro* μέθοδο μετακινείται σε μικρά φυτά που έχουν μήκος 2-10 cm. Μοναδικό μειονέκτημα της νέας μεθόδου είναι η ανάγκη εξειδίκευσης σε θέματα ιστοκαλλιέργειας από τους χρήστες της μεθόδου.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο φυτοδείκτης της μεξικανικής λιμεττίας για μελέτη της μορφογένεσης μικροφυτών *in vitro* που παρήχθησαν από 4 απομονώσεις προσβεβλημένες με την σοβαρή τοπική απομόνωση του ιού της τριστέζας CYARI 5, την μετρίως σοβαρή απομόνωση CYARI 11, την ήπια απομόνωση CYARI 24 και τη πολύ ήπια CYARI 7. Η ανάπτυξη των μικροφυτών της μεξικανικής λιμεττίας παρουσίασε διαφοροποίηση ως προς την κάθε απομόνωση του ιού με τις σοβαρές απομονώσεις να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις ήπιες και τους υγιείς μάρτυρες. Οι ήπιες απομονώσεις είχαν ομοιότητες στην ανάπτυξη με τους υγιείς μάρτυρες.

Ο *in vitro* βιολογικός χαρακτηρισμός του ιού της τριστέζας με μικρομοσχεύματα μεξικανικής λιμεττίας σε σχέση με τον βιολογικό χαρακτηρισμό στο θερμοκήπιο (κεφάλαιο 3) υστερεί ως προς την ακρίβεια εκδήλωσης των συμπτωμάτων και κατάταξη των απομονώσεων σε σχέση με τα συμπτώματα που προκαλούνται στα 5 φυτά δείκτες. Όμως η εργασία στο θερμοκήπιο είναι πολύ χρονοβόρα και επίπονη, αφού χρειάζονται 24 μήνες, ενώ με την *in vitro* μέθοδο τα αποτελέσματα είναι ταχύτερα και χρειάζονται μόνο ένα μήνα.

Η *in vitro* μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για ταχύ βιολογικό διαχωρισμό των σοβαρών από τις ήπιες φυλές του ιού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΥΠΡΙΑΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΤΕΖΑΣ ΤΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

5.1. Περίληψη

Κατά τα έτη 2008-2016 μελετήθηκε η γενετική παραλλακτικότητα 50 απομονώσεων του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών (*Citrus tristeza virus*, CTV) που είχαν συλλεγεί από διάφορες περιοχές και είδη του γένους *Citrus* sp. της Κύπρου, από τις επαρχίες Λευκωσίας, Λεμεσού, Λάρνακας, Πάφου και ελεύθερης Αμμοχώστου οι οποίες είχαν μεταφερθεί και εμβολιαστεί στο φυτοδείκτη της μεξικανικής λιμεττίας στο ιολογικό θερμοκήπιο του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών. Οι 50 απομονώσεις που επιλέγησαν είχαν μελετηθεί σε επίπεδο βιολογικών δεικτών και εκτός από τη Μεξικανική λιμεττία είχαν εμβολιαστεί σε είδη πορτοκαλιάς, μανταρινιάς και γκρέιφρουτ. Για σκοπούς μελέτης των μοριακών χαρακτηριστικών έγινε ενίσχυση του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης (Capsid protein gene, CPG) με την αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcription, RT) και την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) με ολιγονουκλεοτιδιακούς εκκινητές που ενισχύουν προϊόν μεγέθους 672 ζευγών βάσεων (ζβ). Ακολούθησε καθαρισμός και μοριακή κλωνοποίηση του προϊόντος της RT-PCR και προσδιορισμός της νουκλεοτιδιακής του αλληλουχίας. Κατόπιν τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη βάση δεδομένων του NCBI και κατασκευάστηκε φυλογενετικό διάγραμμα με τη συμπερίληψη δημοσιευμένων απομονώσεων/στελεχών του ιού από το εξωτερικό, καθώς και από προηγούμενες μελέτες που έγιναν στην Κύπρο. Τα αποτελέσματα έδειξαν την κατάταξη των κυπριακών απομονώσεων σε έξι φυλογενετικές ομάδες, δύο εκ των οποίων περιλαμβάνουν στελέχη και απομονώσεις που προκαλούν ήπια συμπτώματα (16 και 9 απομονώσεις αντίστοιχα), μία ομάδα με απομονώσεις που προκαλούν συμπτώματα μέτριας σοβαρότητας που αναφέρεται σε παρακμή χωρίς την πρόκληση βοθρίωσης (10 απομονώσεις), μία ομάδα με απομονώσεις που προκαλούν συμπτώματα παρακμής χωρίς βοθρίωση (4 απομονώσεις) και δύο ομάδες με στελέχη και απομονώσεις που προκαλούν σοβαρά συμπτώματα ταχείας παρακμής και βοθρίωσης σε πορτοκαλιά και γκρέιφρουτ (2 και 10 απομονώσεις, αντίστοιχα).

5.2. Εισαγωγή

Ο ιός της τριστεύζας των εσπεριδοειδών (*Citrus tristeza virus*, CTV) προκαλεί μια από τις πιο καταστροφικές ασθένειες των εσπεριδοειδών διεθνώς. Μέχρι στιγμής έχουν προσδιοριστεί και καταγραφεί αρκετά στελέχη που σχετίζονται με διάφορα βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως η πρόκληση διαφορετικού εύρους και έντασης συμπτωμάτων στα διάφορα είδη και ποικιλίες των εσπεριδοειδών (Roistacher and Moreno, 1991), η ικανότητα μετάδοσης με τις αφίδες-φορείς (Roistacher and Bar Joseph, 1984), ή η ικανότητα τους να επάγουν σταυροειδή προστασία στους ξενιστές τους που προσβάλλονται (Van Vuuren *et al.*, 1991).

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1970 μέχρι και σήμερα, έγιναν σημαντικές προσπάθειες για την εξεύρεση μεθόδων προσδιορισμού και διαχωρισμού των στελεχών/φυλών του CTV που σχετίζονται με συμπτώματα ταχείας παρακμής και κατάρρευσης των δέντρων, βοθρίωσης και παραμόρφωσης του ξυλώματος, με εκείνα που προκαλούν ήπια συμπτώματα που σε αρκετές περιπτώσεις είναι ανεπαίσθητα και δεν προκαλούν υποβάθμιση της παραγωγής εσπεριδοειδών. Αρχικά η προσπάθεια επικεντρώθηκε στη χρήση βιολογικών δεικτών και της κατηγοριοποίησης των συμπτωμάτων που εκδηλώνονται σε διαφορετικά είδη και ποικιλίες του είδους *Citrus* sp. Παρόλο που η μέθοδος είναι ίσως η πιο αξιόπιστη, μειονεκτεί στο ότι είναι χρονοβόρα και έχει υψηλό κόστος (Barrister Olmos *et al.*, 1993). Κατόπιν, αναπτύχθηκαν διάφορες ορολογικές τεχνικές και μονοκλωνικά αντισώματα κατάλληλα για να ανιχνεύουν τις ήπιες από τις σοβαρές φυλές (Permar *et al.*, 1991). Ωστόσο η μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα των στελεχών του ιού ανά την υφήλιο έδειξε ότι η χρήση των ειδικών αντισωμάτων δεν ήταν αξιόπιστη για να κατατάξει τις φυλές σε ήπιες και σοβαρές. Η μεγάλη πρόοδος των βιολογικών επιστημών που άρχισε περί τις αρχές της δεκαετίας του 1990, οδήγησε την επιστημονική κοινότητα στην υιοθέτηση σύγχρονων μοριακών τεχνικών ως εργαλείο μελέτης της γενετικής ποικιλομορφίας στελεχών του ιού και προσπάθειας για συσχέτισή τους με την πρόκληση βιολογικών συμπτωμάτων. Σε αυτό το πλαίσιο εφαρμόστηκαν μέθοδοι πεπτιδικής ανάλυσης και χαρτογράφησης (Guerrì *et al.*, 1990), ανάλυσης δίκλωνου RNA (Dodds *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1990), αντίδρασης υβριδισμού με μοριακούς ανιχνευτές (Rosner *et al.*, 1986), αναλύσεις συγκεκριμένων γονιδίων του ιού

όπως της καψιδιακής πρωτεΐνης (Capsid protein Gene, CPG) με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών και της ανάλυσης πολυμορφισμού θραυσμάτων του γονιδίου (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Gillings *et al.*, 1993), ανάλυσης πολυμορφισμού απλής έλικας DNA (Single strand conformational polymorphism, SSCP) (Rubio *et al.*, 1996) και προσδιορισμός και σύγκριση της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας διαφόρων γονιδίων ή και ολόκληρου του γονιδιώματος των ιών (Karasev *et al.*, 1995; Parayiannis *et al.*, 2007; Nolasco *et al.*, 2009).

Στην Κύπρο, η πρώτη προσπάθεια για διερεύνηση των μοριακών χαρακτηριστικών του ιού CTV σε απομονώσεις που είχαν συλλεγεί κατά τη διάρκεια των επισκοπήσεων, έγινε στις αρχές του 2000. Τα αποτελέσματα της μελέτης για 10 απομονώσεις έδειξαν ότι στην Κύπρο εντοπίζονται διάφορα στελέχη που σχετίζονται με την πρόκληση τόσο ήπιων συμπτωμάτων, όσο και σοβαρών συμπτωμάτων παρακμής και βοθρίωσης. Η φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης των κυπριακών απομονώσεων έδειξε ότι παρουσίαζαν υψηλή ομοιότητα με αντίστοιχες απομονώσεις από Αφρική, Αμερική, Ασία και δυτική Ευρώπη (Parayiannis *et al.*, 2007). Ωστόσο διαπιστώθηκε η ανάγκη για την περαιτέρω μελέτη απομονώσεων και αποσαφήνιση της συχνότητας εμφάνισης των ήπιων και των σοβαρών στελεχών στη μεγάλονησο. Στο πλαίσιο της εργασίας έγινε μοριακός χαρακτηρισμός των απομονώσεων του CTV που μελετήθηκαν με τη χρήση βιολογικών δεικτών στο Κεφ 3 με τη χρήση μοριακών δοκιμών και τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας του γονιδίου CP. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδιακή αλληλουχία του γονιδίου CP απομονώσεων του CTV που συλλέγησαν από διάφορες περιοχές και ξενιστές της Κύπρου. Τέλος, έγινε σύγκριση και φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών που αποκτήθηκαν με αντίστοιχες δημοσιευμένες, από διάφορες γεωγραφικές περιοχές.

5.3. Υλικά και Μέθοδοι

5.3.1. Αντιδραστήρια

Τα χημικά υλικά, τα αντιδραστήρια μοριακής βιολογίας και το σύνολο του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.3.**, ενώ η διαδικασία απομόνωσης

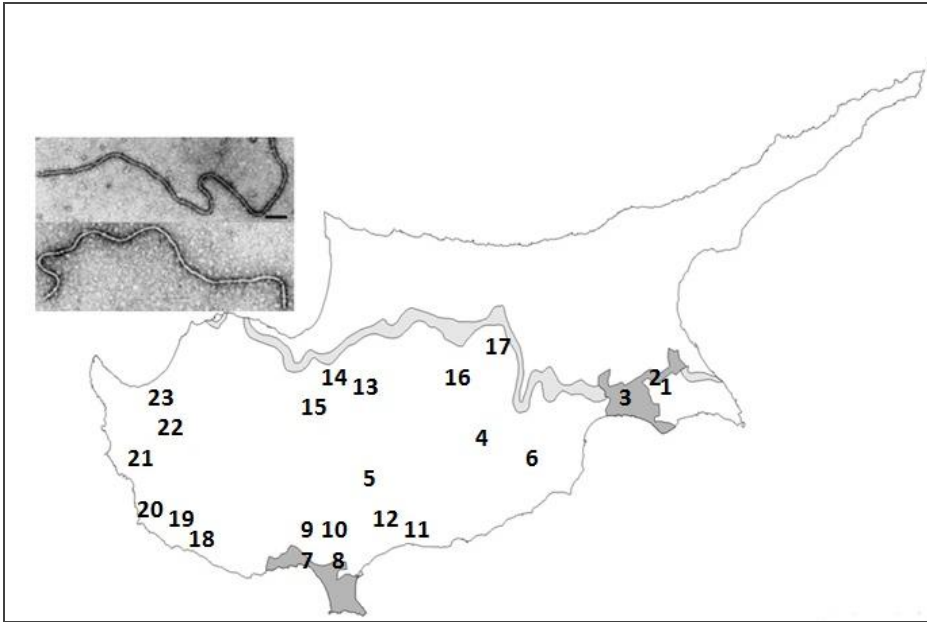
ολικού RNA, και ενίσχυσης, κλωνοποίησης και προσδιορισμού του γονιδίου CP που μελετήθηκε αναφέρονται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 2.4 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι.

5.3.2. Δειγματοληψίες από εσπεριδοειδή προσβεβλημένα με CTV

Για τη διερεύνηση της γενετικής παραλλακτικότητας του ιού CTV από την Κύπρο πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες και συλλογή δειγμάτων από εσπεριδοειδή που είχαν καταγραφεί ως προσβεβλημένα από προηγούμενες επισκοπήσεις που έγιναν κατά την εφαρμογή του Σχεδίου αντιμετώπισης του ιού. Επιπρόσθετα στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν οι απομονώσεις που χαρακτηρίστηκαν βιολογικά στο Κεφ. 3. Κάθε δείγμα αποτελείτο από τέσσερις βλαστικές κορυφές που συνελέγησαν από τις τέσσερις πλευρές του δένδρου.

Πίνακας 5.1. Περιοχές από τις οποίες έγινε η συλλογή των απομονώσεων CTV που μελετήθηκαν

Επαρχία	Περιοχή συλλογής	Κωδικός Χάρτη	Αριθμός απομονώσεων
Αμμοχώστου	Αυγόρου	1	4
	Βρυσούλες	2	2
Λάρνακας	Ξυλοτύμπου	3	3
	Μοσφιλωτή	4	3
	Αρακαπάζ	5	3
	Καμάρες	6	1
Λεμεσός	Φασούρι	7	9
	Τραχώνι	8	1
	Κολόσσι	9	3
	Ύψωνας	10	1
	Πύργος	11	2
	Παρεκκλησιά	12	2
Λευκωσία	Περιστερώνα	13	1
	Αστρομερίτης	14	3
	Κουτραφάς	15	1
	Στρόβολος	16	1
	Καϊμακλί	17	1
Πάφος	Μαντριά	18	1
	Λέμπα	19	1
	Κάτω Πάφος	20	1
	Πέγεια	21	2
	Σκουλλί	22	1
	Πόλις	23	2
ΣΥΝΟΛΟ		23	50



Εικόνα 5.1. Περιοχές συλλογής των δειγμάτων από τις τέσσερις επαρχίες της ελεύθερης Κύπρου. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις περιοχές δειγματοληψίας σύμφωνα με τον Πίνακα 5.1.

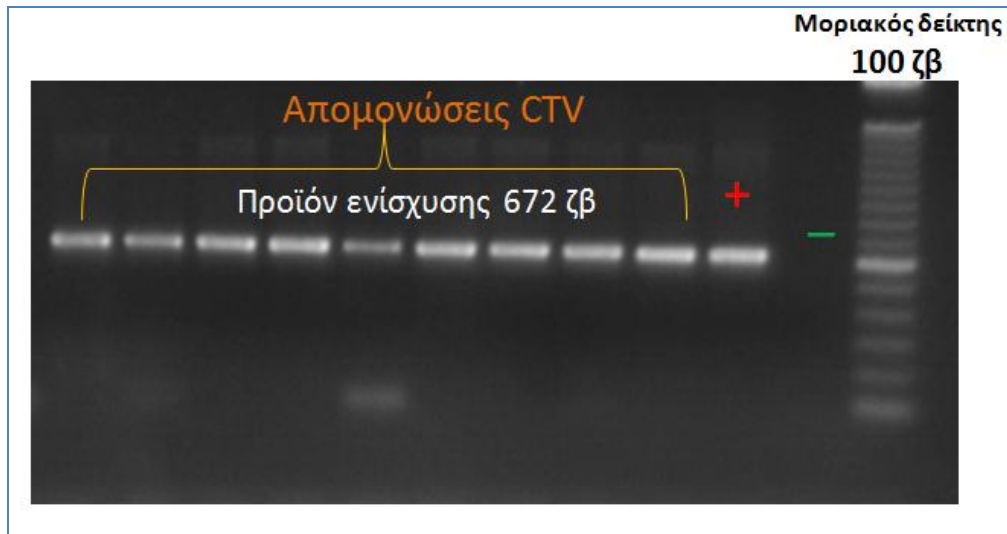
Πίνακας 5.2. Κωδικοί νουκλεοτιδιακών αλληλουχιών από δημοσιευμένα στελέχη του ιού CTV που καταγράφηκαν σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές και ξενιστές που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογενετική ανάλυση

Συντομογραφία απομόνωσης	Κωδικός	Χώρα Προέλευσης	Ξενιστής	Καταγραφέντα συμπτώματα
T36	<i>U16304</i>	ΗΠΑ	Citrus sinensis	Ταχεία παρακμή- χωρίς βοθρίωση
T3	<i>DQ355053</i>	ΗΠΑ	Citrus sp.	Ταχεία παρακμή- βοθρίωση
T318A	<i>DQ151548</i>	Ισπανία	C. sinensis	Ταχεία παρακμή- βοθρίωση
VT	<i>U56902</i>	Ισραήλ	Citrus sp.	Ταχεία παρακμή- βοθρίωση
T385	<i>Y18420</i>	Ισπανία	Citrus sp.	Παρακμή
28C	<i>AF184118</i>	Πορτογαλία	Citrus sp.	Βαθμιαία παρακμή
19-121	<i>AF184114</i>	Ισπανία	Citrus sp.	Βαθμιαία παρακμή
SYR-A2	<i>FN667582</i>	Συρία	C. sinensis	Ταχεία παρακμή- βοθρίωση
QS2	<i>FN552118</i>	Συρία	C. sinensis	Ταχεία παρακμή- βοθρίωση
25-120	<i>AF184115</i>	Πορτογαλία	Citrus sp.	Βαθμιαία παρακμή
GR9-28	<i>KF196271</i>	Ελλάδα	Citrus sp.	Βαθμιαία παρακμή
Tap1-cl6	<i>JQ339726</i>	Ιταλία	C. sinensis	Βαθμιαία παρακμή
B249	<i>KC841818</i>	Βενεζουέλα	C. sinensis	Ταχεία παρακμή- βοθρίωση
CY 92-67	<i>EF491670</i>	Κύπρος	Grapefruit	Παρακμή
CY 92-365	<i>EF491678</i>	Κύπρος	Grapefruit	Βαθμιαία παρακμή
CY 93-10	<i>EF491676</i>	Κύπρος	Grapefruit	Χωρίς συμπτώματα
CY 89-507	<i>EF491675</i>	Κύπρος	Eureka lemon	Χωρίς συμπτώματα
CY 98-33	<i>EF491671</i>	Κύπρος	Valencia sweet orange	Βαθμιαία παρακμή
CY 89-60	<i>EF491673</i>	Κύπρος	Clementine	Παρακμή – νανισμός
CY 89-197	<i>EF491672</i>	Κύπρος	Clementine	Παρακμή – νανισμός
CY 96-18	<i>EF491677</i>	Κύπρος	Ortanique	Χωρίς συμπτώματα
CY 94-37	<i>EF491680</i>	Κύπρος	Valencia s.orange	Παρακμή – βοθρίωση
CY 95-14	<i>EF491667</i>	Κύπρος	Grapefruit	Βαθμιαία παρακμή

5.4.Αποτελέσματα

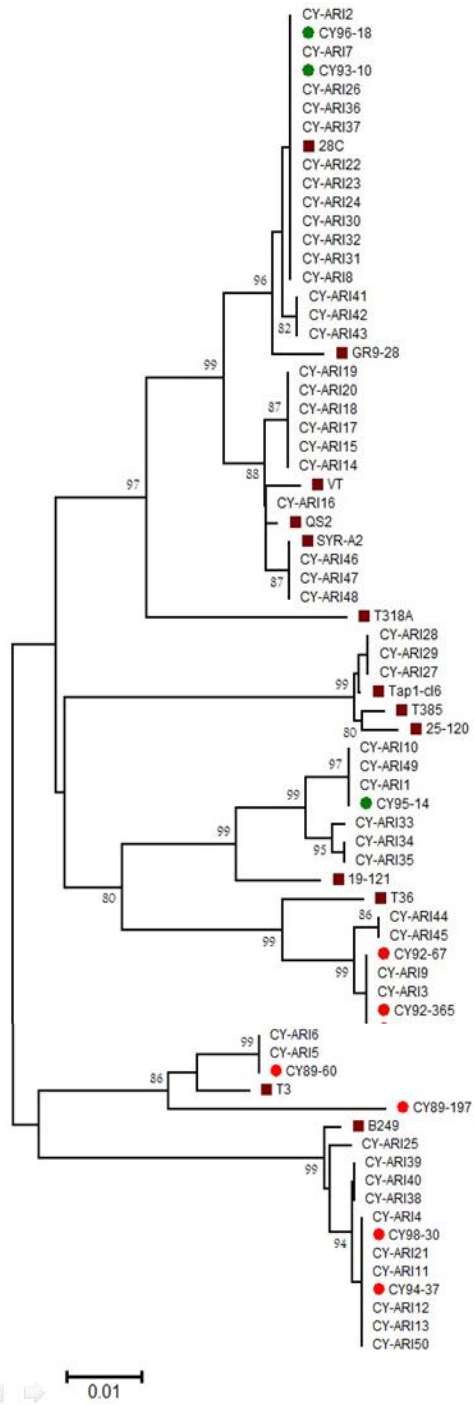
5.4.1. Ενίσχυση με RT-PCR του γονιδίου CP και προσδιορισμός των νουκλεοτιδιακών αλληλουχιών του γονιδίου CP

Με την RT-PCR έγινε ενίσχυση του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης των κυπριακών απομονώσεων που έχει μέγεθος 672 ζβ (Εικόνα 5.X). Ακολούθησε προσδιορισμός της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας του γονιδίου CP από τις 50 απομονώσεις του ιού CTV. Οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν παραθέτονται στο Παράρτημα της διατριβής.



Εικόνα 5.2. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της CP των απομονώσεων που μελετήθηκαν

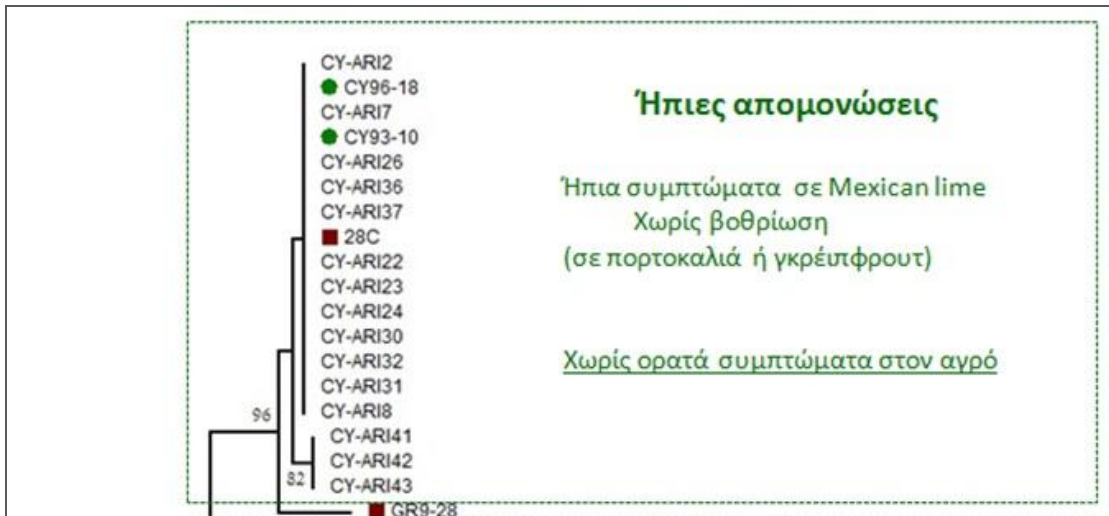
Οι νουκλεοτιδιακές αλληλουχίες συγκρίθηκαν και στοιχήθηκαν με αντίστοιχες δημοσιευμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων καταχωρημένων στη βάση NCBI. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης μεταξύ των Κυπριακών απομονώσεων σε επίπεδο νουκλεοτιδίων έδειξαν ότι εντοπίζονται διαφορές που κυμαίνονται από 92-100% (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.4. Φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάστηκε με τη μέθοδο εκτίμησης μητρών απόστασης (Neighbour Joining, NJ) 1000 επαναλήψεων, χρησιμοποιώντας τις νουκλεοτιδιακές αλληλουχίες των απομονώσεων του CTV που αποκτήθηκαν, καθώς και άλλες δημοσιευμένες απομονώσεις του ιού από προηγούμενες μελέτες. Η γεωγραφική προέλευση, και τα φυτά ξενιστές απομονώσεων φαίνονται στους Πίνακες

3.4 και 5.1. Οι πληροφορίες των δημοσιευμένων απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2.

Το δενδρόγραμμα έδειξε την παρουσία 6 ομάδων από απομονώσεις που προκαλούν διαφορετική ένταση και τύπο συμπτωμάτων. Διακρίνονται οι δύο ομάδες από ήπιες απομονώσεις που δεν προκαλούν συμπτώματα στον αγρό, ενώ προκάλεσαν ήπια συμπτώματα στο φυτοδείκτη της Μεξικανικής λιμεττίας. Οι ήπιες απομονώσεις δεν προκαλούν βοθρίωση σε πορτοκαλιά ή γκρέιπφρουτ [(Ομάδα Α: απομονώσεις CY-ARI 2, 7, 8, 22-24, 26, 30-32, 41-43) Εικόνα 5.5 και Ομάδα Γ: (CY-ARI 1, 10, 27-29, 33-35, και 49)] (Εικόνα 5.6).



Εικόνα 5.5. Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Α που περιλαμβάνει τις ήπιες απομονώσεις που δεν προκαλούν ορατά συμπτώματα σε εσπεριδοειδή στον αγρό



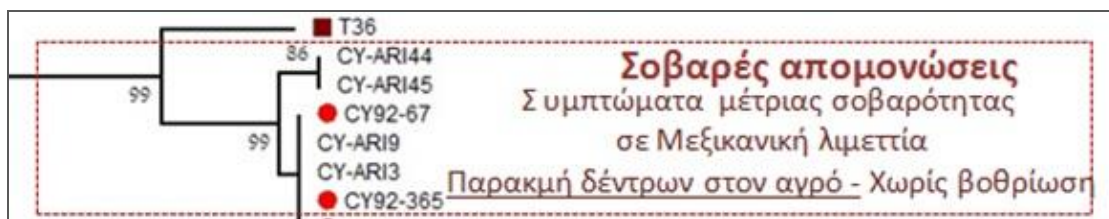
Εικόνα 5.6. Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Γ που περιλαμβάνει τις ήπιες απομονώσεις που δεν προκαλούν ορατά συμπτώματα σε εσπεριδοειδή στον αγρό

Η ομάδα Β περιλαμβάνει απομονώσεις που προκαλούν συμπτώματα μέτριας σοβαρότητας που αναφέρονται σε βαθμιαία παρακμή των δένδρων στον αγρό και συμπτώματα διαφάνειας νευρώσεων και νανισμού στον βιολογικό δείκτη της μεξικανικής λιμεττίας. Οι απομονώσεις που κατατάσσονται στην ομάδα Β είναι οι CY-ARI 14-20 και 46-48) (Εικόνα 5.7).



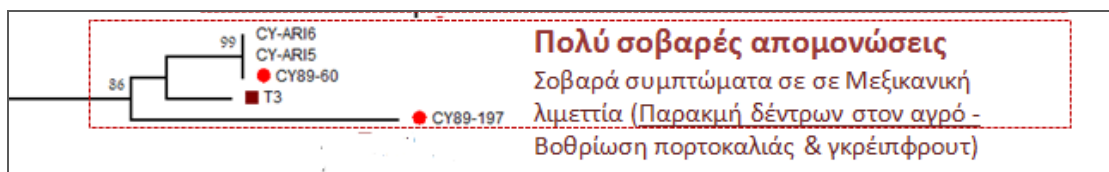
Εικόνα 5.7. Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Β που περιλαμβάνει τις απομονώσεις μέτριας σοβαρότητας που προκαλούν συμπτώματα βαθμιαίας παρακμής στον αγρό

Οι υπόλοιπες ομάδες Δ, Ε και Ζ περιλαμβάνουν σοβαρές έως πολύ σοβαρές απομονώσεις σύμφωνα με τα συμπτώματα που προκαλούν στον αγρό και στα φυτά-δείκτες που εμβολιάστηκαν. Ειδικότερα οι απομονώσεις CY-ARI3, 9, 44 και 45 προκάλεσαν συμπτώματα έντονης παρακμής στα δένδρα τόσο στον αγρό όσο και στα είδη που μολύνθηκαν σε πειραματικό επίπεδο (Εικόνα 5.8).



Εικόνα 5.8. Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Δ που περιλαμβάνει τις σοβαρές απομονώσεις που προκαλούν συμπτώματα ταχείας παρακμής στον αγρό χωρίς βοθρίωση

Τέλος, ιδιαίτερα σοβαρές είναι οι απομονώσεις CY-ARI5 και 6 που προκαλούν εκτός από ταχεία παρακμή και βοθρίωση σε πορτοκαλιά και γκρέιπφρουτ (Εικόνα 5.9). Τέλος οι απομονώσεις CY-ARI4, 11-13, 21, 25, 38-40 και 50 φαίνεται να ευθύνονται για την πρόκληση συμπτωμάτων ταχείας παρακμής και σε αρκετές περιπτώσεις βοθρίωσης στελέχους σε πορτοκαλιά και γκρέιπφρουτ (Εικόνα 5.10).



Εικόνα 5.9. Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων E που περιλαμβάνει τις σοβαρές απομονώσεις που προκαλούν συμπτώματα παρακμής στον αγρό και βοθρίωση σε πορτοκαλιά και γκρέιπφρουτ



Εικόνα 5.10. Φυλογενετική ομάδα απομονώσεων Z που περιλαμβάνει τις σοβαρές απομονώσεις που προκαλούν συμπτώματα ταχείας παρακμής στον αγρό και βοθρίωση σε πορτοκαλιά και γκρέιπφρουτ

5.5. Συζήτηση

Μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί και καταγραφεί μερικές εκατοντάδες απομονώσεις και στελέχη του ιού CTV διεθνώς. Τα στελέχη του ιού έχουν χαρακτηριστεί στη βάση των βιολογικών συμπτωμάτων και των μοριακών χαρακτηριστικών διαφόρων γονιδίων. Οι κύριες κατηγορίες/ομάδες των στελεχών του ιού είναι εκείνες που προκαλούν ήπια

συμπτώματα, τα οποία μπορεί να διακριθούν μόνο στον ειδικό φυτοδείκτη της μεξικανικής λιμεττίας, εκείνες που προκαλούν παρακμή στα εσπεριδοειδή που μολύνονται και είναι εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά (βαθμιαία ή ταχεία), και εκείνες που προκαλούν συμπτώματα βοθρίωσης σε γκρέιπφρουτ και πορτοκαλιά. Ορισμένα στελέχη έχουν αναφερθεί να προκαλούν ίκτερο, ωστόσο η επιδημιολογική σημασία τους στον αγρό δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Niblet *et al.*, 2000). Είναι γενικά παραδεκτό ότι η καλύτερη μέθοδος κατηγοριοποίησης και χαρακτηρισμού των στελεχών είναι ο εμβολιασμός βιολογικών δεικτών και η παρατήρηση της εκδήλωσης των συμπτωμάτων. Ωστόσο η μέθοδος έχει υψηλό κόστος, απαιτεί τη διάθεση ειδικών θερμοκηπιακών μονάδων, εκπαιδευμένου προσωπικού, ενώ η ακριβής λήψη αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων απαιτεί σημαντικό χρόνο που μπορεί να κυμαίνεται από 12-36 μήνες (Ballester-Olmos *et al.*, 1993). Η ανάγκη για ταχύ χαρακτηρισμό των στελεχών του ιού είναι επιτακτική στις εσπεριδοειδοπαραγωγικές περιοχές όπου ενδημεί ο ιός αφενός για να υπάρχει επαρκής πρόγνωση των οικονομικών επιπτώσεων στην παραγωγή και αφετέρου στην υιοθέτηση στρατηγικών αντιμετώπισης και αποφυγής της εισαγωγής των σοβαρών στελεχών σε μια περιοχή (Niblet *et al.*, 2000).

Η αλματώδης ανάπτυξη των βιοτεχνολογικών επιστημών και η υιοθέτηση των μοριακών τεχνικών στην επιστήμη της φυτοπαθολογίας τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει συμβάλει στην εφαρμογή μεθόδων χαρακτηρισμού που βασίζονται στη μελέτη και ανάλυση των νουκλεϊνικών οξέων των παθογόνων στόχων. Όσον αφορά τον CTV, η μελέτη του γονιδίου της καμψιδιακής πρωτεΐνης έχει συμβάλει τα μέγιστα στην κατηγοριοποίηση των στελεχών και στη συσχέτισή τους με την πρόκληση συγκεκριμένων συμπτωμάτων στους ξενιστές. Σε προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν, η φυλογενετική ανάλυση και μελέτη του γονιδίου CP έδωσε τη δυνατότητα για κατηγοριοποίηση των απομονώσεων που καταγράφηκαν διεθνώς σε επτά ομάδες (Zemzani *et al.*, 1999; Nolasco *et al.*, 2007). Στις ομάδες υπήρξε σαφής διαχωρισμός των στελεχών που ήταν ήπιες και δεν προκαλούσαν ορατά συμπτώματα στους ξενιστές, και εκείνων που ήταν σοβαρές προκαλώντας συμπτώματα που κυμαίνονται από βαθμιαία μέχρι ταχεία παρακμή ή σχετιζόνταν με την επαγωγή συμπτωμάτων βοθρίωσης σε πορτοκαλιά και γκρέιπφρουτ.

Στο πλαίσιο προηγούμενης μελέτης περιορισμένης έκτασης που έγινε στην Κύπρο είχαν προσδιοριστεί τόσο ήπια όσο και σοβαρά στελέχη τα οποία εντάσσονταν σε 5 από τις 7 φυλογενετικές ομάδες που καταγράφηκαν με βάση τα στελέχη που εντοπίστηκαν σε διεθνές επίπεδο. Ειδικότερα, εντοπίστηκαν απομονώσεις που ήταν ήπιες, που προκαλούσαν βαθμιαία ή ταχεία παρακμή, ή συνδυασμό παρακμής με βοθρίωση σε βλαστούς πορτοκαλιάς και γκρέιπφρουτ (Parayiannis et al., 2007).

Η παρούσα μελέτη είχε στόχο τον μοριακό χαρακτηρισμό των απομονώσεων που μελετήθηκαν στο πλαίσιο του βιολογικού χαρακτηρισμού (Κεφ.3.), καθώς και άλλων απομονώσεων από περιοχές εσπεριδοειδοκαλλιέργειας σε όλη την ελεύθερη Κύπρο. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ευρεία διάδοση ποικίλων στελεχών στη μεγαλόνησο. Εικοσιτέσσερις απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν σε δύο φυλογενετικές ομάδες που περιλαμβάνουν ήπια στελέχη από την Πορτογαλία και την Ισπανία, ενώ δέκα άλλες κατατάχθηκαν στην ομάδα με στελέχη μέτριας σοβαρότητας από τη Μέση Ανατολή. Οι υπόλοιπες απομονώσεις χαρακτηρίζονται ως σοβαρές και κατατάσσονται στις ομάδες στις οποίες περιλαμβάνονται στελέχη από την Αμερική και την Αφρική, τα οποία έχουν καταγραφεί να σχετίζονται με συμπτώματα ταχείας παρακμής και αποπληξίας. Δέκα από τις απομονώσεις που μελετήθηκαν φαίνεται ότι εντάσσονται σε μια νέα ομάδα μαζί με στελέχη από το Ισραήλ και τη Συρία με μέτρια σοβαρότητα. Σημειώνεται ότι στην προηγούμενη μελέτη που είχε γίνει για το χαρακτηρισμό απομονώσεων από την Κύπρο, δεν είχαν εντοπιστεί απομονώσεις που να κατατάσσονται στη συγκεκριμένη ομάδα.

Τα αποτελέσματα δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για την παρουσία ήπιων και σοβαρών στελεχών του ιού στην Κύπρο. Η παρουσία στελεχών που προκαλούν ταχεία ξήρανση και παρακμή κρίνεται ως εξαιρετικά ενδιαφέρουσα και σημαντική εξαιτίας της ευρείας χρήσης του ευπαθούς υποκειμένου της νερατζιάς στη νήσο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΑΥΡΟΕΙΔΟΥΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΠΙΚΩΝ ΗΠΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΤΕΖΑΣ ΤΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

6.1.Περίληψη

Διεξήχθησαν προκαταρκτικά πειράματα σταυροειδούς προστασίας (cross protection) στο θερμοκήπιο με χρήση δύο ήπιων τοπικών απομονώσεων του ιού της τριστεζας. Κατά την μέθοδο αυτή, η οποία χρησιμοποιείται για αντιμετώπιση σοβαρών φυλών βοθρίωσης του ξύλου παρουσία της αφίδας *Toxoptera citricida*, μια ήπια φυλή του ιού εισάγεται σε ένα δενδρύλλιο και αυτό λειτουργεί σαν προστατευτικό από μετέπειτα επιμόλυνση με άλλη σοβαρή φυλή του ιού. Οι ήπιες απομονώσεις του ιού CY ARI-7 και CY ARI-24 χρησιμοποιήθηκαν για σταυροειδή προστασία δενδρυλλίων *Washington navel*, τα οποία ήταν εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά και μετέπειτα μολύνθηκαν με την σοβαρή απομόνωση CY ARI-5 που προκαλεί βοθρίωση του ξύλου. Τα δενδρύλλια που αναπτύχθηκαν σε γλάστρες στο θερμοκήπιο μολύνθηκαν τεχνητά με τις ήπιες απομονώσεις και μετά από ένα χρόνο μολύνθηκαν με την σοβαρή απομόνωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βοθρίωση του ξύλου παρουσιάστηκε στα δενδρύλλια που ήταν προσβεβλημένα μόνο με την σοβαρή απομόνωση, ενώ δεν υπήρχε στα δενδρύλλια που είχαν υποβληθεί σε σταυροειδή προστασία και είχαν μολυνθεί με τις ήπιες απομονώσεις και αργότερα με την σοβαρή. Επιπρόσθετα, στα δενδρύλλια που είχαν υποβληθεί σε σταυροειδή προστασία δεν σημειώθηκε μείωση του ύψους των δενδρυλλίων, ενώ σημειώθηκε μείωση του ύψους των δενδρυλλίων στα δενδρύλλια που ήταν προσβεβλημένα μόνο με την σοβαρή απομόνωση. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά, αλλά για να είναι αξιόπιστα και με ουσιαστική αγρονομική σημασία πρέπει το πείραμα να διεξαχθεί σε συνθήκες αγρού.

6.2. Εισαγωγή

Η σταυροειδής προστασία (cross protection), ή αμοιβαία προστασία με χρήση ήπιων φυλών του ιού, είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μια ήπια φυλή του ιού που έχει μολύνει ένα δενδρύλλιο το προστατεύει από μετέπειτα επιμόλυνση με άλλη σοβαρή φυλή του ιού που μπορεί να προσβάλει αργότερα το ίδιο δένδρο. Έτσι το δένδρο αυτό δεν εκδηλώνει τα καταστροφικά συμπτώματα που θα προκαλούσε η μόλυνση του μόνο με την σοβαρή φυλή. (Lee *et al.*, 1987; Lee et Keremane, 2013; Folimonova 2013).

Στις περιοχές όπου κυριαρχούν σοβαρές φυλές του ιού που προκαλούν βοθρίωση του ξύλου και ενδημεί η αφίδα *Toxoptera citricida*, που είναι ο κύριος φορέας μετάδοσης των σοβαρών φυλών του ιού, η μέθοδος της σταυροειδούς προστασίας είναι η μόνη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αντιμετώπιση της τριστέζας.

Η σταυροειδής προστασία με χρήση ήπιων φυλών του ιού της τριστέζας δεν θεωρείται μόνιμη λύση για προστασία των δένδρων από οικονομικές ζημιές που προκαλεί η μόλυνση με σοβαρές φυλές του ιού και επίσης δεν αποτελεί μορφή ανεκτικότητας στον ιό. Προσφέρει μόνο μια παράταση της οικονομικής ζωής των δένδρων (Lee *et al.*, 1992).

Η αντιμετώπιση του ιού της τριστέζας σε μια περιοχή με χρήση ήπιων φυλών του ιού για σταυροειδή προστασία θεωρείται ως η τελευταία επιλογή μεθόδου αντιμετώπισης του ιού εκεί όπου καμιά άλλη μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί.

Η σταυροειδής προστασία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε πολλές χώρες καλλιέργειας εσπεριδοειδών στον κόσμο για προστασία από σοβαρές φυλές του ιού της τριστέζας. Στην Αυστραλία χρησιμοποιήθηκε για αντιμετώπιση σοβαρής βοθρίωσης του ξύλου σε δένδρα γκρέιπφρουτ. Έτσι τα τελευταία 35-40 χρόνια όλα τα γκρέιπφρουτ μολύνονται με την ήπια φυλή PB61 (Zhou *et al.*, 2002).

Στη Βραζιλία η σταυροειδής προστασία χρησιμοποιείται για προστασία των πορτοκαλιών Pera από τις σοβαρές φυλές βοθρίωσης του ξύλου (Muller and Costa 1987; Muller and Rezende, 2004).

Στο Περού εισήχθησαν σοβαρές φυλές βοθρίωσης το 1950 με την εισαγωγή μανταρινιών Σατσούμα από την Ιαπωνία (Roistacher, 1988) και έτσι χρησιμοποιήθηκε η σταυροειδής προστασία για αντιμετώπιση της τριστεζας σε καλλιέργειες Navel και Lime (Bederski *et al.*, 2005; Roistacher *et al.*, 2010).

Στη Νότιο Αφρική η ήπια φυλή GFMS12 χρησιμοποιείται για προστασία των γκρέιπφρουτ (Kotze and Marais 1976; Marais and Kotze 1984; Marais *et al.*, 1993; Marais 1994), ενώ η ήπια φυλή LM56 χρησιμοποιείται για προστασία των lime (van Vuuren *et al.*, 1993) καθώς επίσης και για προστασία καλλιεργειών πορτοκαλιών και μανταρινιών (Lutting *et al.*, 2002). Τέλος, η ήπια φυλή GFMS35 χρησιμοποιείται για προστασία καλλιεργειών κοκκινόσαρκων γκρέιπφρουτ Star Ruby καθώς και άλλων ποικιλιών γκρέιπφρουτ (Marais and Bregtenbach, 1996; da Graca and van Vuuren, 2010).

Στην Ιαπωνία χρησιμοποιείται η μέθοδος της σταυροειδούς προστασίας για προστασία των εσπεριδοειδών από σοβαρές φυλές βοθρίωσης του ξύλου (Sasaki, 1979; Ieki *et al.*, 1997).

Σαν ήπια φυλή του ιού της τριστεζας (mild strain) καθορίζεται η φυλή η οποία προκαλεί ήπια συμπτώματα στο φυτό δείκτη της μεξικανικής λιμεττίας (ML) που είναι πολύ ευαίσθητο για ανάπτυξη των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων που προκαλεί ο ιός (διαφάνεια νευρώσεων φύλλου, καρούλιασμα φύλλου, βοθρίωση ξύλου). Η ύπαρξη και η ένταση του ιού καθορίζεται και από την αντίδραση του κατά την ορολογική μέθοδο ELISA καθώς και με μοριακή ταυτοποίηση.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η μέθοδος της σταυροειδούς προστασίας με χρήση δύο ήπιων κυπριακών απομονώσεων του ιού της τριστεζας, για προστασία πορτοκαλιών W. navel από μετέπειτα προσβολή με σοβαρή τοπική απομόνωση του ιού.

6.3. Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν δενδρύλλια πορτοκαλιάς Washington navel εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά τα οποία μολύνθηκαν τεχνητά με την ήπια τοπική απομόνωση CY ARI-7 του ιού της τριστέζας. Η απομόνωση αυτή επιλέγηκε αφού δεν παρουσίασε κανένα σύμπτωμα στην μεξικανική λιμεττία και η ένταση του ιού ήταν χαμηλή κατά την αντίδραση του στην ορολογική μέθοδο ELISA και χαρακτηρίστηκε σαν ήπια μετά τον βιολογικό και μοριακό χαρακτηρισμό (Κεφάλαιο 3 και 5).

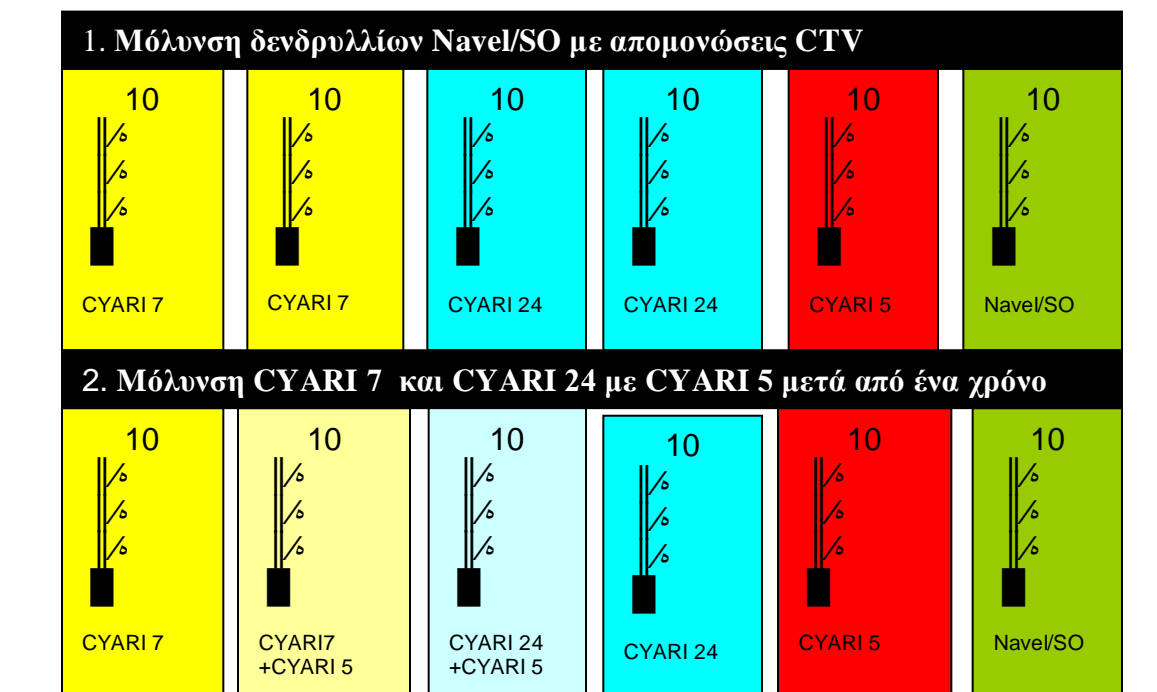
Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν δενδρύλλια πορτοκαλιάς Washington navel εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά τα οποία μολύνθηκαν τεχνητά με την ήπια τοπική απομόνωση CY ARI-24 του ιού της τριστέζας. Η απομόνωση αυτή επιλέγηκε αφού παρουσίασε ήπια συμπτώματα στην μεξικανική λιμεττία, η ένταση του ιού ήταν χαμηλή κατά την αντίδραση του στην ορολογική μέθοδο ELISA και χαρακτηρίστηκε σαν ήπια μετά τον βιολογικό και μοριακό χαρακτηρισμό (Κεφάλαιο 3 και 5).

Αργότερα τα ίδια δενδρύλλια μολύνθηκαν με την σοβαρή απομόνωση CY ARI-5 (Σχήμα 6.1). Η φυλή αυτή παρουσίασε σοβαρά συμπτώματα βοθρίωσης του ξύλου σε όλα τα φυτά δείκτες (κεφάλαιο 3) και η ένταση του ιού ήταν ψηλή κατά την αντίδραση του στην ορολογική μέθοδο ELISA. Εξάλλου, κατά τον βιολογικό και μοριακό χαρακτηρισμό χαρακτηρίστηκε σαν σοβαρή (Κεφάλαιο 3 και 5).

Οι 3 πιο πάνω απομονώσεις είχαν μεταδοθεί στα μητρικά δενδρύλλια μεξικανικής λιμεττίας απ' όπου λήφθηκαν οι φλοιοί που χρησιμοποιήθηκαν για τις τεχνητές μολύνσεις με αφίδες *Aphis gossypii*, ώστε να αποκλειστεί ή ύπαρξη άλλων ιών ή ιοειδών από το αρχικό υλικό (Costa and Muller 1980; Fulton 1986; Roistacher *et al.*, 1988; Van Vuuren *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Fuch *et al.*, 1997; Zhang and Holt 2001; Sambade *et al.*, 2002; Folimonov *et al.*, 2007; Mooney *et al.*, 2007).

Πειραματικό Σχέδιο: Πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο με 10 επαναλήψεις για κάθε δοκιμή.

- α) 20 δενδρύλλια πορτοκαλιάς μολύνθηκαν με την ήπια απομόνωση CY ARI-24,
- β) 20 δενδρύλλια πορτοκαλιάς μολύνθηκαν με την ήπια απομόνωση CY ARI-7,
- γ) 10 δενδρύλλια μολύνθηκαν με την σοβαρή απομόνωση CY ARI-5 και χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικοί μάρτυρες,
- δ) 10 δενδρύλλια παρέμειναν υγιή και χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικοί μάρτυρες,
- ε) τα 20 δενδρύλλια που μολύνθηκαν με τις ήπιες απομόνωσεις μολύνθηκαν ξανά μετά από 12 μήνες με την σοβαρή απομόνωση CY ARI-5 (Σχήμα 6.1)



Σχήμα 6.1. Πείραμα σταυροειδούς προστασίας δενδρυλλίων Washington navel εμβολιασμένων σε κιτρομηλιά από την σοβαρή απομόνωση του ιού της τριστεζας CYARI 5 με χρήση των ήπιων απομονώσεων CYARI 7 και CYARI 24.

Μετρήσεις/παρατηρήσεις: Ύψος δενδρυλλίου, ύψος νεοεκπτυχθέντος βλαστού μετά από κλάδεμα, εμφάνιση βοθρίωσης ξύλου, εμφάνιση χλώρωσης φύλλων, ή/και άλλα συμπτώματα.

6.4. Αποτελέσματα

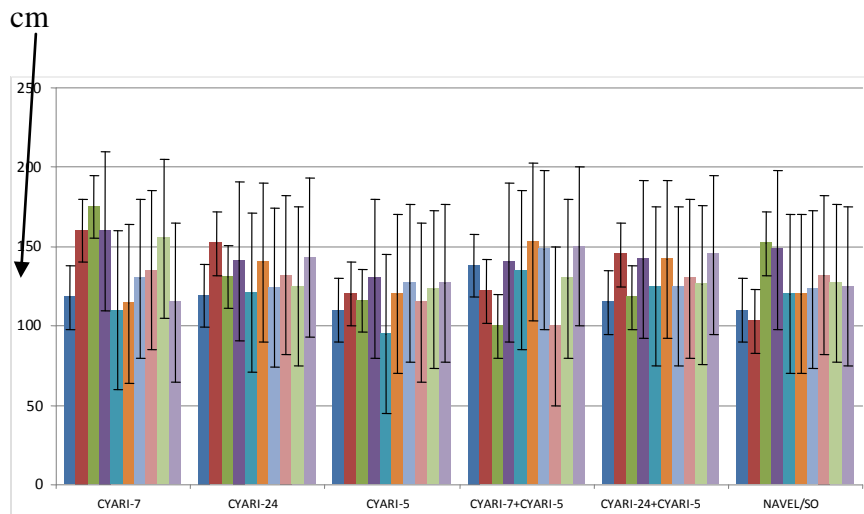
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βοθρίωση του ξύλου παρουσιάστηκε σε 6 από τα 10 δενδρύλλια που ήταν προσβεβλημένα μόνο με την σοβαρή απομόνωση CYARI 5 στους 24 μήνες και σε 9 από τα 10 στους 36 μήνες. Συμπτώματα βοθρίωσης δεν υπήρχαν στα δενδρύλλια που είχαν υποβληθεί σε σταυροειδή προστασία και είχαν μολυνθεί με τις ήπιες απομονώσεις CYARI 7 και CYARI 24 και αργότερα με την σοβαρή CYARI 5. Επιπρόσθετα, σε κανένα από τα υπόλοιπα δενδρύλλια δεν σημειώθηκαν συμπτώματα βοθρίωσης του ξύλου (Σχήμα 6.4).

Στα δενδρύλλια που είχαν υποβληθεί σε σταυροειδή προστασία δεν σημειώθηκε μείωση του ύψους των δενδρυλλίων, ενώ σημειώθηκε μείωση του ύψους των δενδρυλλίων στα δενδρύλλια που ήταν προσβεβλημένα μόνο με την σοβαρή απομόνωση (Σχήμα 6.2) στους 12 μήνες.

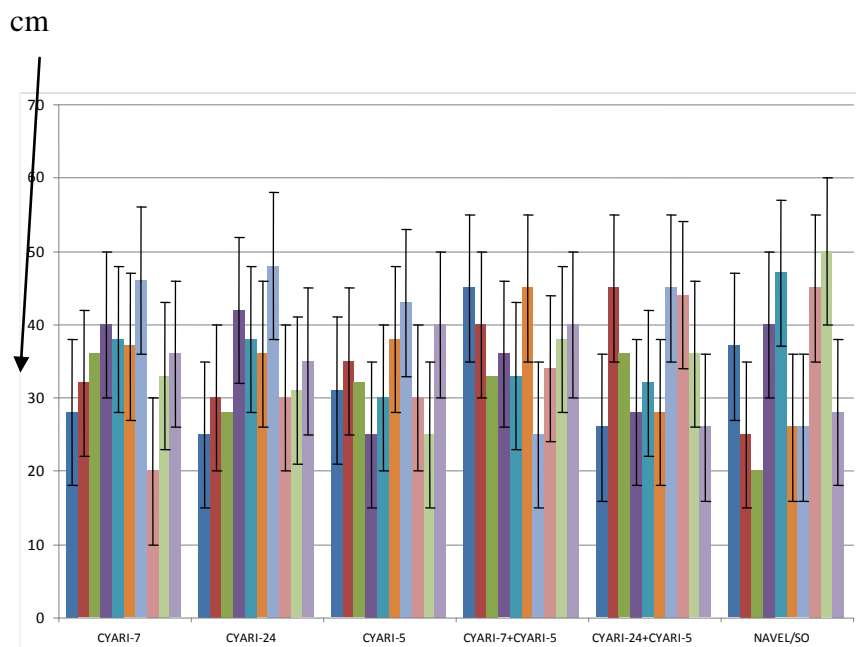
Συγκεκριμένα, τα δενδρύλλια πορτοκαλιάς που είχαν μολυνθεί με τις ήπιες απομονώσεις CYARI 7 και CYARI 24 είχαν μέσο όρο ύψους 137,2 και 132,8 cm αντίστοιχα, δύο χρόνια μετά την έναρξη των πειραμάτων. Τα δενδρύλλια που είχαν μολυνθεί με την σοβαρή απομόνωση CYARI 5 είχαν μέσο όρο ύψους 118,3 cm και τα δενδρύλλια πορτοκαλιάς που δεν είχαν μολυνθεί είχαν μέσο όρο ύψους 126 cm. Τα δενδρύλλια που είχαν υποβληθεί σε σταυροειδή προστασία για την CYARI 5 και είχαν μολυνθεί αρχικά με τις ήπιες απομονώσεις CYARI 7 και CYARI 24 είχαν μέσο όρο ύψους 131,6 cm και 131,3 cm, αντίστοιχα.

Στα δενδρύλλια που είχαν υποβληθεί σε σταυροειδή προστασία δεν σημειώθηκε μείωση του ύψους των νέων βλαστών μετά από κλάδεμα, ενώ σημειώθηκε μείωση του ύψους των δενδρυλλίων στα δενδρύλλια που ήταν προσβεβλημένα μόνο με την σοβαρή απομόνωση (Σχήμα 6.3) στους 30 μήνες. Αναλυτικά, τα δενδρύλλια πορτοκαλιάς που είχαν μολυνθεί με τις ήπιες απομονώσεις CYARI 7 και CYARI 24 είχαν μέσο όρο ύψους νέου βλαστού 34,6 και 34,3 cm, αντίστοιχα, 30 μήνες μετά την εφαρμογή της σταυροειδούς προστασίας. Τα δενδρύλλια που είχαν μολυνθεί με την σοβαρή

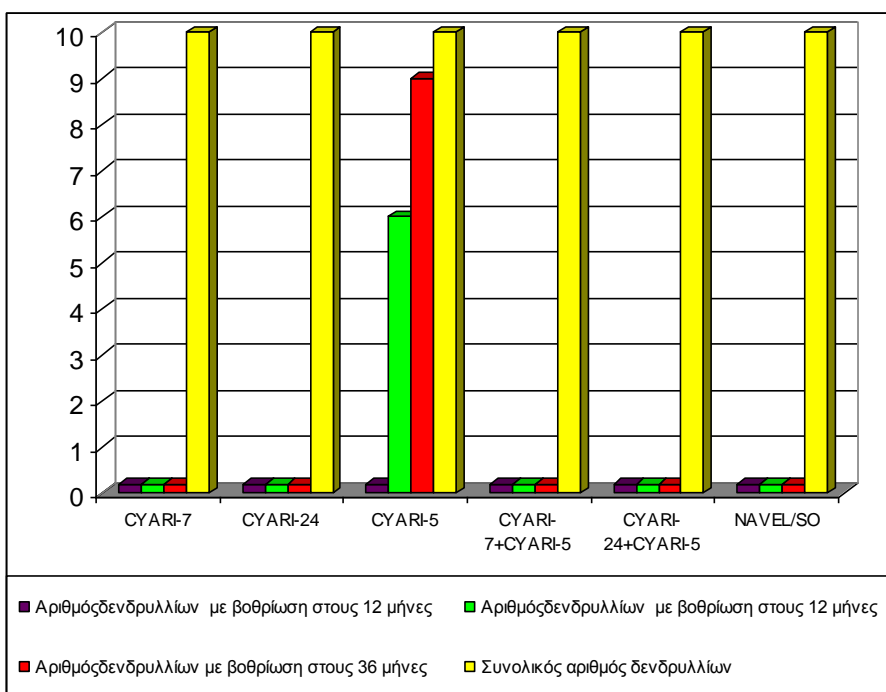
απομόνωση CYARI 5 είχαν μέσο όρο ύψους νέου βλαστού 32,9 cm και τα δενδρύλλια πορτοκαλιάς που δεν είχαν μολυνθεί είχαν μέσο όρο ύψους νέου βλαστού 34,4 cm. Τα δενδρύλλια που είχαν υποβληθεί σε σταυροειδή προστασία για την CYARI 5 και είχαν μολυνθεί αρχικά με τις ήπιες απομονώσεις CYARI 7 και CYARI 24 είχαν μέσο όρο ύψους νέου βλαστού 36,9 cm και 34,6 cm, αντίστοιχα .



Σχήμα 6.2. Ύψος των δενδρυλλίων Navel/SO σε cm δύο χρόνια μετά την έναρξη των πειραμάτων.



Σχήμα 6.3. Ύψος των νέων βλαστών των δενδρυλλίων Navel/SO σε cm 30 μήνες μετά την εφαρμογή της σταυροειδούς προστασίας



Σχήμα 6.4. Εμφάνιση συμπτωμάτων βοθρίωσης του ξύλου στα δένδρα Navel/SO

6.5. Συζήτηση

Η απουσία από την Κύπρο του εντόμου *Toxoptera citricida*, που είναι ο φορέας των σοβαρών φυλών βοθρίωσης του ιού της τριστέζας, επιτρέπει την αντιμετώπιση του ιού στο παρόν στάδιο με χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, εκριζώσεις και χρήση ανεκτικών υποκειμένων. Όμως, ο κίνδυνος εισαγωγής του εντόμου καθώς και νέων φυλών του ιού που ίσως είναι πιο σοβαρής μορφής και κατά συνέπεια περισσότερο επικίνδυνες από τις τοπικές φυλές του ιού, θα διαφοροποιήσει τη σημερινή κατάσταση όπου η τριστέζα βρίσκεται υπό έλεγχο. Με πιθανές εισαγωγές πολλαπλασιαστικού υλικού μολυσμένου με επικίνδυνες φυλές τριστέζας από άλλες χώρες, είτε με εισαγωγή του εντόμου φορέα *T. citricida*, του αποτελεσματικότερου φορέα του ιού, η αντιμετώπιση της τριστέζας θα καταστεί εξαιρετικά δύσκολη και οι συνέπειες για την εσπεριδοκαλλιέργεια θα είναι δραματικές. Στις περιοχές όπου κυριαρχούν σοβαρές φυλές

του ιού που προκαλούν βοθρίωση του ξύλου και ενδημεί η αφίδα *T. Citricida*, που είναι ο κύριος φορέας μετάδοσης των σοβαρών φυλών του ιού, η μέθοδος της σταυροειδούς προστασίας είναι η μόνη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σήμερα για αντιμετώπιση της τριστέζας.

Είναι φανερό ότι με την ένταξη της Κύπρου στην Ευρωπαϊκή Ένωση και την φιλελευθεροποίηση του εμπορίου, ο κίνδυνος εισαγωγής εχθρών και ασθενειών είναι μεγαλύτερος. Υπάρχουν πολλοί εχθροί και ασθένειες καταστροφικοί για τα εσπεριδοειδή που σήμερα δεν υπάρχουν στον τόπο μας, από τους οποίους η εσπεριδοκαλλιέργεια πρέπει να διαφυλαχθεί. Ο κίνδυνος εισαγωγής του εντόμου *T. citricida* είναι υπαρκτός, αφού βρίσκεται ήδη στην Πορτογαλία και την Ισπανία.

Σε περίπτωση εισαγωγής της *Toxoptera citricida* στον τόπο μας η διάδοση των σοβαρών φυλών βοθρίωσης του ιού θα είναι αναπόφευκτη. Έτσι, η εξεύρεση ήπιων απομονώσεων του ιού που θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε Προγράμματα σταυροειδούς προστασίας είναι καθοριστικής σημασίας για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

Οι ήπιες απομονώσεις που μπορούν να δράσουν σαν προστατευτικές μπορεί να προέλθουν από επιλογή ήπιων τοπικών απομονώσεων που παρουσιάζουν ήπια αντίδραση στη μεξικανική λιμεττία και που όταν συνδυαστούν με σοβαρές απομονώσεις παρέχουν προστασία στα δενδρύλλια (Roistacher *et al.*, 2010). Κατά την μελέτη αυτή έγινε προσπάθεια εφαρμογής της μεθόδου αυτής στο θερμοκήπιο. Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν κατά την εφαρμογή των προκαταρκτικών αυτών πειραμάτων με χρήση των δύο ήπιων τοπικών απομονώσεων του ιού της τριστέζας CY ARI-7 και CY ARI-24, είναι ενθαρρυντικά για σταυροειδή προστασία δενδρυλλίων Washington navel εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά από μετέπειτα προσβολή με την σοβαρή απομόνωση CY ARI-5. Όμως, για να είναι πιο αξιόπιστα τα αποτελέσματα πρέπει το πείραμα να επαναληφθεί σε συνθήκες αγρού.

Η εφαρμογή της σταυροειδούς προστασίας για αντιμετώπιση σοβαρών φυλών του ιού της τριστέζας σε κάποιες περιοχές όπως στη Ν. Αφρική, Ν. Αμερική κ.ά., ήταν επιτυχής για κάποιες ποικιλίες (Rubio *et al.*, 2013). Όμως, σε άλλες περιοχές η εφαρμογή της ίδιας

μεθόδου δεν ήταν επιτυχής (Roistacher *et al.*, 1993; Sambade *et al.*, 2007). Αυτό δείχνει ότι εκτός από την φυλή του ιού και το είδος της ποικιλίας, η επιτυχία της σταυροειδούς προστασίας σε μια περιοχή έχει σχέση και με τις συνθήκες του περιβάλλοντος (Moreno *et al.*, 2008).

Πολλοί ερευνητές έχουν αποδείξει ότι οι ήπιες απομονώσεις του ιού που προέρχονται από την ίδια περιοχή υπερέχουν από τις ήπιες απομονώσεις που μπορεί να εισαχθούν από άλλες περιοχές (Zanutto *et al.* 2013; Lee and Keremane, 2013). Ένας τρόπος δημιουργίας προστατευτικών φυλών του ιού σε περιοχές όπου δεν υπάρχουν ήπιες φυλές στο φυσικό περιβάλλον λόγω της υπεροχής των σοβαρών φυλών, είναι η εξασθένιση της μολυσματικότητας των σοβαρών απομονώσεων με μετάδοση τους με αφίδες σε φυτά *Passiflora* και αργότερα μετάδοση με αφίδες από την *Passiflora* σε φυτά μεξικανικής λιμεττίας (Roistacher *et al.*, 2010). Υλικό από την μεξικανική λιμεττία που είναι μολυσμένο με τον ιό εμβολιάζεται στα 5 φυτά δείκτες (πορτοκαλιά, πορτοκαλιά εμβολιασμένη σε κιτρομηλιά, γκρέιπφρουτ, κιτρομηλιά και μεξικανική λιμεττία) ώστε να χαρακτηριστεί η απομόνωση και να διαπιστωθεί αν είναι ήπια. Η χρονοβόρα και περίπλοκη αυτή διαδικασία παραγωγής ήπιων φυλών από σοβαρές, όπως παρουσιάζεται από τους Roistacher *et al.*, 2010, καταδεικνύει την σημασία της επιλογής από το φυσικό περιβάλλον και διατήρησης ήπιων φυλών σε μια χώρα. αφού η επιλογή τοπικής φυλής φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματική για σταυροειδή προστασία (Lee and Keremane, 2013).

Οι ήπιες απομονώσεις CY ARI-7 και CY ARI-24, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή, καθώς και άλλες που χαρακτηρίστηκαν σαν «ήπιες» (Κεφάλαια 3 και 5) πολλαπλασιάστηκαν σε δενδρύλλια μεξικανικής λιμεττίας ώστε να υπάρξει η δυνατότητα μελλοντικής χρήσης τους. Επιπρόσθετα, πολλαπλασιάστηκαν *in vitro*, για περαιτέρω διαφύλαξη τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

7.1. Περίληψη

Για εξυγίανση δενδρυλλίων εσπεριδοειδών προσβεβλημένων με τον ιό της τριστεζάς η/και με ιοειδή δοκιμάστηκαν οι μέθοδοι της χημειοθεραπείας, θεραπείας χαμηλών θερμοκρασιών, θερμοθεραπείας και μικροεμβολιασμού *in vitro*. Χρησιμοποιήθηκαν δεκατέσσερα δενδρύλλια που περιλαμβάνουν τις ποικιλίες λεμονιάς Αδαμοπούλου, Βέρνα, Πολύφορης και Λαπήθου, τις ποικιλίες πορτοκαλιάς Navelina, Washington navel, Γιάφφα, Σιεκέρικο και Αιματούσικη, τις ποικιλίες μανταρινιάς Clasuelina, Page και Αρακαπά και τα είδη Φράππα και Περγαμόντ. Τα δενδρύλλια αυτά ελέγχθηκαν για ιούς και ιοειδή με την βιολογική μέθοδο των φυτών δεικτών, με ELISA για CTV και CPsV και RT-PCR για ιοειδή. Βρέθηκαν όλα απηλλαγμένα από CPsV, CVV, concave gum και impietratura ενώ ένα ήταν προσβεβλημένο με CTV. Όλα ήταν επίσης προσβεβλημένα με ιοειδή. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν για σκοπούς πειραματισμού τρία δενδρύλλια Μεξικανικής λιμετίας (ML) προσβεβλημένα με την σοβαρή τοπική απομόνωση του ιού της τριστεζάς CYARI 5, την ήπια απομόνωση CYARI 24 και τη πολύ ήπια CYARI 7. Η μέθοδος του μικροεμβολιασμού χρησιμοποιήθηκε για εξυγίανση όλων των δενδρυλλίων. Η χημειοθεραπεία και θερμοθεραπεία δοκιμάστηκαν για εξυγίανση των δενδρυλλίων ML από τον ιό της τριστεζάς. Η θεραπεία με χρήση χαμηλών θερμοκρασιών δοκιμάστηκε για εξυγίανση δενδρυλλίων λεμονιάς Λαπήθου προσβεβλημένων με CEVd και HSVd. Τα μικροεμβολιασμένα φυτά μετεμβολιάστηκαν σε υγιή δενδρύλλια κитρομηλιάς ή φυτεύτηκαν σε γλάστρες και όσα αναπτύχθηκαν μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο. Ακολούθως, ελέγχθηκαν μετά από 6-9 μήνες για τυχόν ύπαρξη των παθογόνων που υπήρχαν στο αρχικό μητρικό υλικό. Ένα ή περισσότερα φυτά που παρήχθησαν με μικροεμβολιασμό βρέθηκαν απηλλαγμένα από ιοειδή και CTV. Η εξυγίανση των μεριστωμάτων από CTV επετεύχθη με χημειοθεραπεία *in vitro* με την χρήση 30, 40 και 50 mg/lι ριμπαβιρίνης και με θερμοθεραπεία. Η εξυγίανση των ML από CTV ήταν δυνατή στους 40° C και στους 38 ° C σε ποσοστό 11%. Πολλά όμως φυτά καταστράφηκαν μετά από την έκθεση στις ψηλές θερμοκρασίες. Η εξυγίανση των

μεριστωμάτων της λεμονιάς Λαπήθου από ιοειδή με θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών δεν ήταν δυνατή στους 10 ° C για 5 εβδομάδες αλλά επιτεύχθηκε στους 4 ° C για 5 εβδομάδες.

7.2. Εισαγωγή

Η εξυγίανση του πολλαπλασιαστικού υλικού και η απαλλαγή του από ιούς, ιοειδή και φυτοπλάσματα είναι πολύ σημαντική για την παραγωγή ελεγχμένου πολλαπλασιαστικού υλικού τόσο των εσπεριδοειδών όσο και άλλων δένδρων που πολλαπλασιάζονται με αγενή πολλαπλασιασμό. Τα φυτά που πολλαπλασιάζονται αγενώς και προέρχονται από πολλαπλασιαστικό υλικό που είναι προσβεβλημένο με ένα ή περισσότερους παθογόνους μικροοργανισμούς παραμένουν για όλη τη ζωή τους προσβεβλημένα, αφού οι παθογόνοι αυτοί οργανισμοί δεν καταπολεμούνται με κανένα χημικό ή άλλο τρόπο στο χωράφι (Roossinck, 1997). Όμως, οι ιοί και τα συναφή παθογόνα μεταδίδονται στα νέα φυτά που παράγονται με τον αγενή πολλαπλασιασμό των μητρικών προσβεβλημένων φυτών. Έτσι, η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, καθώς και η χρήση ποικιλιών με καθορισμένα και αξιόλογα γενετικά χαρακτηριστικά, είναι απαραίτητη για την πρόληψη των ιολογικών ασθενειών και των τεράστιων ζημιών που προκαλούνται απ' αυτές και για την δημιουργία μιας οικονομικά και βιολογικά βιώσιμης καλλιέργειας (Hadidi *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2001). Για την εξυγίανση του πολλαπλασιαστικού υλικού εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι όπως η θερμοθεραπεία, η θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών, η μεριστωματική καλλιέργεια, ο μικροεμβολιασμός, η χημειοθεραπεία και η κρυοθεραπεία. Οι μέθοδοι αυτές μπορεί να εφαρμοστούν και σε συνδυασμό μεταξύ τους για εξυγίανση συγκεκριμένων παθογόνων (Varveri *et al.*, 2015).

Η παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών γινόταν τα παλαιότερα χρόνια (Roistacher *et al.*, 1976) με φύτευση σπόρων και επιλογή των καλύτερων σποροφύτων μετά από σειρά ετών. Μοσχεύματα των σποροφύτων αυτών (nucellar) ήταν η βάση του υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Η μέθοδος αυτή ήταν χρονοβόρα και δαπανηρή και τα παραγόμενα σπορόφυτα παρουσίαζαν γενετική παραλλακτικότητα σε

σχέση με το μητρικό φυτό, καθώς και χαρακτήρες νεανικότητας, όπως η καθυστέρηση καρποφορίας για αρκετά χρόνια (Weathers and Calavan, 1959).

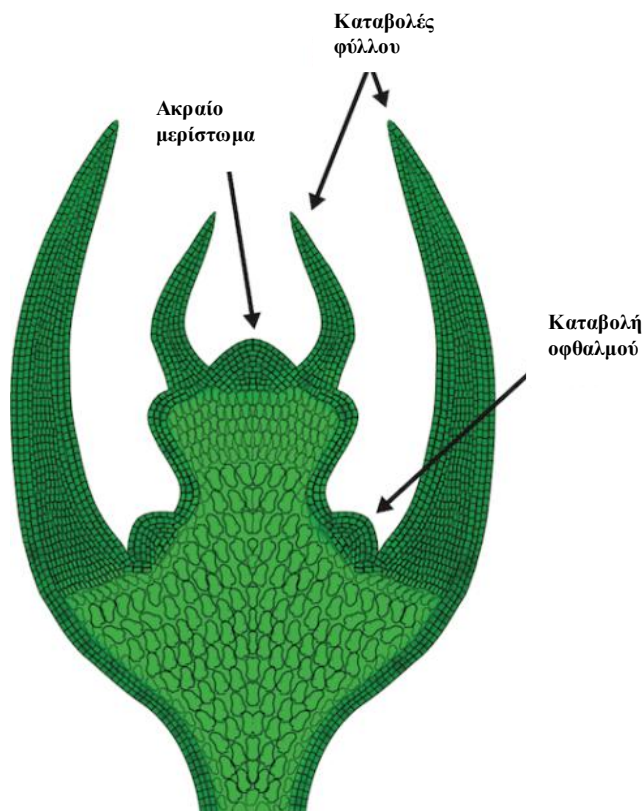
Άλλος τρόπος παραγωγής υγιών δενδρυλλίων ήταν και η καλλιέργεια σπόρων *in vitro* (Bitters *et al.*, 1972), αλλά και η μέθοδος αυτή παρουσίαζε τα μειονεκτήματα της προηγούμενης μεθόδου. Η εφαρμογή της θερμοθεραπείας (Calavan *et al.*, 1972) δεν έδωσε καλά αποτελέσματα καθώς η εξάλειψη όλων των ιολογικών και συναφών ασθενειών δεν κατέστη δυνατή, αφού τα ιοειδή της καχεξίας και του εξωκόρτη και τα φυτοπλάσματα παρέμεναν στα δενδρύλλια που είχαν υποβληθεί σε θερμοθεραπεία. Η θερμοθεραπεία όμως χρησιμοποιήθηκε για εξάλειψη των ιών CTV και CPsV (Grant, 1967; Muhammat *et al.*, 2005; Roistacher, 1977).

Ένας παρεμφερής τρόπος εξεύρεσης υγιών φυτών ήταν και ο έλεγχος για τις γνωστές ιολογικές ασθένειες των δένδρων που μπορούσαν να γίνουν δότες εμβολίων (Reuther *et al.*, 1972). Η μέθοδος αυτή είναι χρονοβόρα και υπάρχει πάντα η πιθανότητα της μη εξεύρεσης δένδρων απηλλαγμένων από ιολογικές ασθένειες, αφού τα ιοειδή είναι συνήθως ευρέως διαδεδομένα λόγω της ευκολίας μετάδοσης τους με μηχανικά μέσα (Barbosa *et al.*, 2005). Με την εφαρμογή της μεριστωματικής καλλιέργειας φάνηκε ότι μπορούν να παραχθούν φυτά με αγενή πολλαπλασιασμό ίδια με τα μητρικά και απαλλαγμένα από παθογόνους μικροοργανισμούς (Boxus, 1998; Faccioli and Marani, 1998; George, 1993). Τα ξυλώδη φυτά όμως δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν με καλλιέργεια μεριστωμάτων σε θρεπτικό υπόστρωμα (Navarro 1988, George 1993) και το 1975 αναπτύχθηκε από τους Navarro, Roistacher και Murashige, η μέθοδος του μεριστωματικού εμβολιασμού ή μικροεμβολιασμού σε σωλήνα για την εξυγίανση των εσπεριδοειδών. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού των εσπεριδοειδών σε όλες τις χώρες παραγωγής εσπεριδοειδών, όπως ή Ισπανία, οι ΗΠΑ, η Βραζιλία, το Ισραήλ, η Αυστραλία, η Νότιος Αφρική κ.ά. (Navarro *et al.*, 1975; Navarro *et al.*, 1976; Navarro *et al.*, 1991; Skaria *et al.*, 1992; Mukhopadhyay *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2001; Ioannou *et al.*, 1991, Kapari-Isaia *et al.*, 2002; Kapari-Isaia *et al.*, 2007; Kapari-Isaia *et al.*, 2011).

Το ακραίο μερίστωμα αποτελείται από τις καταβολές των φύλλων από τις οποίες αναπτύσσονται τα νέα φύλλα και είναι το σημείο απ'όπου αναπτύσσεται ο νέος βλαστός του φυτού (Σχήμα 7.1). Οι μεριστωματικοί ιστοί βρίσκονται στην άκρη των βλαστών και ριζών και αποτελούν τα κέντρα διαίρεσης κυττάρων και παραγωγής νέων ιστών και οργάνων του φυτού. Αποτελούν επίσης, κέντρα αποθήκευσης γενετικών πληροφοριών και έχουν την ικανότητα παραγωγής νέων φυτών.

Το ακραίο μερίστωμα είναι συνήθως απηλλαγμένο από ιούς και συναφή παθογόνα για τους εξής λόγους:

- α) Υπάρχει ψηλή συγκέντρωση αυξίνης στα διαιρούμενα κύτταρα του μεριστώματος,
- β) το περιβάλλον του μεριστώματος είναι ακατάλληλο για την αντιγραφή πολλών ιών,
- γ) η ταχύτητα διαίρεσης των κυττάρων του φυτού είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα πολλαπλασιασμού των ιών.



Σχήμα. 7. 1. Ακραίο μερίστωμα (<http://www.shmoop.com/plant-biology/primary-secondary-growth.html>)

Σε περιπτώσεις που το ακραίο μερίστωμα είναι προσβεβλημένο με ιούς και συναφή παθογόνα, αυτά μπορούν σε κάποιες περιπτώσεις να εξαλειφθούν κατά την μεριστωματική καλιέργεια με την βοήθεια των ακόλουθων παραγόντων (Faccioli and Marani, 1998):

- α) δράση χημικών ουσιών που καθορίζουν την αύξηση όπως των κυτοκινίνων και των αυξινών,
- β) παρουσία ουσιών αναστολής όπως οι φαινολαμίνες,
- γ) καταστροφή ενζύμων απαραίτητων για την αντιγραφή των ιών,
- δ) αποδόμηση του RNA του ιού που προκαλείται από την καταστροφή κυττάρων κατά την αποκοπή του μεριστώματος.

Σήμερα, η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται για εξυγίανση του πολλαπλασιαστικού υλικού των εσπεριδοειδών είναι ο μικροεμβολιασμός ή μεριστωματικός εμβολιασμός *in vitro*. Οι υπόλοιπες μέθοδοι εξυγίανσης που αναφέρονται πιο πάνω εφαρμόζονται με βάση τις υπάρχουσες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία σε πολύ μικρή κλίμακα για την εξυγίανση των εσπεριδοειδών. Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιήθηκε από τους Greno *et al.*, 1990, για την εξυγίανση των CTV, CIVV και CEVd και από τους Ohta *et al.*, 2011, για εξυγίανση του ιού του νανισμού της μανταρινιάς Satsuma (*Satsuma dwarf virus*). Ο Koizumi, 1983 αναφέρει την εξυγίανση της μανταρινιάς Σατσούμα από τον ιό *Tatter leaf-citrange stunt virus* με θερμοθεραπεία και μικροεμβολιασμό. Οι Sanjeev *et al.*, 2007, πέτυχαν την εξυγίανση της μανταρινιάς kinnow από τον ιό της δακτυλιωτής κηλίδωσης των εσπεριδοειδών (*Citrus ringspot virus*) με χημειοθεραπεία και μικροεμβολιασμό και οι Volk *et al.*, 2012, αναφέρουν τον συνδυασμό κρυοθεραπείας και μικροεμβολιασμού.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των μεθόδων εξυγίανσης για εξάλειψη των ιοειδών και του ιού της τριστέζας. Για εξυγίανση του CTV δοκιμάστηκαν ο μικροεμβολιασμός, η χημειοθεραπεία και η θερμοθεραπεία. Για την χημειοθεραπεία χρησιμοποιήθηκε η ριμπαβιρίνη (Greno *et al.*, 1990). Η ριμπαβιρίνη είναι αντιικό που ανήκει στην ομάδα των νουκλεοσιδικών αναλόγων και θεωρείται ότι επηρεάζει την παραγωγή ή τη δράση ιικού DNA και RNA, τα οποία είναι απαραίτητα για την επιβίωση

και τον πολλαπλασιασμό των ιών. Για εξυγίανση των ιοειδών CEVd και HSVd δοκιμάστηκε η μέθοδος της θεραπείας χαμηλών θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε σε προηγούμενες εργασίες για εξυγίανση του ιοειδούς των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid*), (Lizarraga *et al.*, 1980; Paduch-Cichal and Krczyński, 1987), και του ιοειδούς της εσχαρώσεως των μήλων (*Apple scar skin viroid*), (Adams *et al.*, 1996) και ο μικροεμβολιασμός.

7.3. Υλικά και Μέθοδοι

7.3.1. Μητρικά Δενδρύλλια για εξυγίανση

Επιλέγηκαν 9 δένδρα των ειδών Περγαμόντο και Φράππας, και των ποικιλιών Λεμονιάς Λαπήθου και Πολύφορης (Εικόνα 7.1), Μανταρινιάς Αρακαπά, και των πορτοκαλιών Γιαφίτικης, Αιματούσικης, Σιεκέρικης και Ομφαλοφόρας από φυτείες της Κύπρου (Καπαρή κ.ά., 2006) που απετέλεσαν το αρχικό μητρικό πολλαπλασιαστικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα εξυγίανσης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι ποικιλίες λεμονιάς Αδαμοπούλου και Βέρνας και μανταρινιάς Clasuelina και Page που εισήχθηκαν από την Ελλάδα στα πλαίσια Προγράμματος Διακρατικής συνεργασίας με το Πανεπιστήμιο Αθηνών (Karagi-Isaia *et al.*, 2011).

Επιπρόσθετα, επιλέγηκαν 3 δενδρύλλια Mexican lime (ML) προσβεβλημένα με την σοβαρή απομόνωση του ιού της τριστέζας CYARI-5, την ήπια απομόνωση CYARI-24 και την πολύ ήπια CYARI-7. Τα δενδρύλλια αυτά, τα οποία είχαν μολυνθεί με τις απομονώσεις του ιού της τριστέζας μετά από μετάδοση τους με την αφίδα *Aphis gossypii*, χρησιμοποιήθηκαν σαν μητρικό υλικό για την παραγωγή περισσότερων δενδρυλλίων Mexican lime τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια των πειραμάτων.

7.3.2. Ιολογικός έλεγχος

Όλα τα μητρικά δένδρα που επιλέγηκαν για εξυγίανση υποβλήθηκαν σε ιολογικό έλεγχο για όλες τις ιολογικές και συναφείς ασθένειες εσπεριδοειδών. Χρησιμοποιήθηκε η βιολογική μέθοδος των φυτών δεικτών (Roistacher, 1991) καθώς και οι εργαστηριακές

μέθοδοι ELISA και RT-PCR (Bar Joseph *et al.*, 1979; Hatdjinicolis *et al.*, 1995; Nolasco *et al.*, 2002).

Όλα τα νέα δενδρύλλια που παρήχθησαν με μικροεμβολιασμό σε σωλήνα και αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά εξετάστηκαν για τους ιούς και ιοειδή που υπήρχαν στα αντίστοιχα μητρικά δένδρα. Μεριστώματα των μικρόφυτων που υπέστησαν χημειοθεραπεία και θερμοθεραπεία εξετάστηκαν με ELISA για CTV και μεριστώματα των μικρόφυτων που υπέστησαν θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών εξετάστηκαν με RT-PCR για CEVd και HSVd.



Εικόνα 7.1 Μητρικό δενδρύλλιο Λεμονιάς Λαπήθου και άλλα είδη και ποικιλίες εσπεριδοειδών προς εξυγίανση

7.3.3.Μικροεμβολιασμός ή μεριστωματικός εμβολιασμός *in vitro*

Για εφαρμογή της μεθόδου αυτής έγινε αρχικά φύτευση σποροφύτων-υποκειμένων *in vitro* κάτω από ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο συνεχούς οριζόντιας ροής αποστειρωμένου αέρα (laminar flow). Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι των υποκειμένων Carrizo και Troyer citrange. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε τα

άλατα MS (Murashige and Skoog, 1962), σακχαρόζη και phytagel (Πίνακας 2.1). Κατά την εφαρμογή του μικροεμβολιασμού από τα σπορόφυτα- υποκείμενα που αναπτύχθηκαν *in vitro*, αφαιρέθηκαν οι κοτυληδόνες και κόπηκε το επικοτύλιο πάνω από τις κοτυληδόνες σε ύψος 2-3 cm. Αφαιρέθηκαν επίσης, όλα τα πλάγια ριζίδια και η ρίζα κόπηκε 2 cm κάτω από τις κοτυληδόνες. Στο πάνω μέρος του υποκειμένου χαραχθηκε ένα ανάποδο T και εκεί τοποθετήθηκε το εμβόλιο μεγέθους 1 - 2 mm. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (25-27 °C) για 15-20 μέρες (Εικόνα 7.2). Η εργασία αυτή γινόταν κάτω από στερεομικροσκόπιο υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα μικροεμβολιασμένα φυτά τοποθετούνταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες διαστάσεων 25x150 mm που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε άλατα MS, inositol, thiamine HCl, pyridoxine HCl, nicotinic acid, σακχαρόζη, και νερό (1 lt). (pH 5.7). Η ακριβής σύσταση του φαίνεται στον Πίνακα 2.8. Τα φυτά στο υγρό υπόστρωμα στηρίζονταν σε ειδικές γέφυρες που κατασκευάζονταν από διηθητικό χαρτί και τοποθετούνταν μέσα στους σωλήνες με το υπόστρωμα. Ακολούθως οι σωλήνες τοποθετούνταν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (22-25 °C) και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Τα μικροεμβολιασμένα φυτά παρακολουθούνταν και σε περίπτωση ανάπτυξης του υποκειμένου πάνω από το σημείο εμβολιασμού ή στα πλάγια αφαιρούνταν οι νέοι αυτοί βλαστοί ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί το μερίστωμα.



Εικόνα 7.2. Μικροεμβολιασμένα μικρόφυτα εσπεριδοειδών σε θάλαμο σταθεράς θερμοκρασίας

7.3.4. Χημειοθεραπεία *in vitro*

Βλαστοί μήκους 10-15 cm και διαμέτρου 3-5 mm συλλέχθηκαν από τα δενδρύλλια Mexican lime (ML) που ήταν προσβεβλημένα με την σοβαρή απομόνωση του ιού της τριστέζας CYARI 5, την ήπια απομόνωση CYARI 24 και την πολύ ήπια CYARI 7, τα οποία διατηρούνται σε γλάστρες στο θερμοκήπιο. Αφού καθαρίστηκαν, προετοιμάστηκαν για αποστείρωση με αφαίρεση των φύλλων και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4°C μέχρι να φυτευτούν στους σωλήνες.

Οι βλαστοί ML που χρησιμοποιήθηκαν για ιστοκαλλιέργεια είχαν μήκος 1-1,5 cm και έφεραν τουλάχιστον ένα οφθαλμό και αφού απολυμάνθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 20%, φυτεύτηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε σωλήνες με θρεπτικά υποστρώματα MS (Murashige & Skoog, 1962) ή Loyd and McCown (1980) εμπλουτισμένα με ριμπαβιρίνη (10, 20, 30, 40, 50 mg/l) η οποία προστέθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα μετά την αποστείρωση του με χρήση μικροβιολογικού φίλτρου (0.2 μm ή 0.45 μm). Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με σταθερά θερμοκρασία 22 °C και μετά την έκπτυξη των φύλλων (Εικόνα 7.4) και διεξήχθη ιολογικός έλεγχος μεριστωμάτων μήκους 1-5 mm που αναπτύχθηκαν στους βλαστούς με την μέθοδο ELISA.

Αλλα μεριστώματα που αναπτύχθηκαν στους σωλήνες που περιείχαν ριμπαβιρίνη εμβολιάστηκαν σε υγιή σπορόφυτα Troyer *in vitro* .

7.3.5.Θερμοθεραπεία

Πέντε δενδρύλλια Mexican lime (ML) που ήταν προσβεβλημένα με την σοβαρή απομόνωση του ιού της τριστέζας CYARI 5 και πέντε δενδρύλλια W. navel προσβεβλημένα με την σοβαρή απομόνωση του ιού της τριστέζας CYARI 5 και με CEVd τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθεράς θερμοκρασίας για θερμοθεραπεία (εικόνα 7.6). Αρχικά η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 28 °C για ένα μήνα και μετά αυξήθηκε στους 35 °C για 16 ώρες και στους 30 °C για 8 ώρες την νύκτα για άλλο ένα μήνα. Ακολούθως, η θερμοκρασία μέρας αυξήθηκε στους 40 °C για 16 ώρες και στους 30 °C για 8 ώρες την νύκτα για τρεις μήνες. Διεξήχθη ιολογικός έλεγχος μεριστωμάτων

μήκους 1-5 mm που αναπτύχθηκαν στους βλαστούς με την μέθοδο ELISA για CTV και RT-PCR για CEVd. Αντίστοιχος αριθμός δενδρυλλίων διατηρήθηκε στο θερμοκήπιο με θερμοκρασία 15-35 °C.

7.3.6. Θερμοθεραπεία *in vitro*

Βλαστοί μήκους 10-15 cm και διαμέτρου 3-5mm συλλέχθηκαν από τα δενδρύλλια Mexican lime (ML) που ήταν προσβεβλημένα με την σοβαρή απομόνωση του ιού της τριστεζας CYARI 5, την ήπια απομόνωση CYARI 24 και την πολύ ήπια CYARI 7, τα οποία διατηρούνται σε γλάστρες στο θερμοκήπιο. Αφού καθαρίστηκαν, προετοιμάστηκαν για αποστείρωση με αφαίρεση των φύλλων και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4°C μέχρι να φυτευτούν στους σωλήνες.

Οι βλαστοί ML που χρησιμοποιήθηκαν για ιστοκαλλιέργεια είχαν μήκος 1-1,5 cm και έφεραν τουλάχιστον ένα οφθαλμό και αφού απολυμάνθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 20%, φυτεύτηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε σωλήνες με θρεπτικά υποστρώματα MS (Murashige & Skoog, 1962) ή Loyd and McCown (1980).

Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με σταθερά θερμοκρασία 22 °C και μετά την έκπτυξη των φύλλων, ορισμένοι σωλήνες μεταφέρθηκαν σε άλλο θάλαμο για την θερμοθεραπεία. Η αύξηση της θερμοκρασίας ήταν σταδιακή για εγκλιματισμό των μικροφυτών στις ψηλότερες θερμοκρασίες. Αρχικά η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 30 °C για 20 μέρες, ακολούθως αυξήθηκε στους 35 °C για 20 μέρες και στους 38 °C για 20 μέρες και τελικά στους 40 °C για δύο μέρες. Διεξήχθηκε ιολογικός έλεγχος μεριστωμάτων μήκους 2-5 mm που αναπτύχθηκαν στους βλαστούς με την μέθοδο ELISA στα διάφορα στάδια.

7.3.7. Θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών *in vitro*

Βλαστοί μήκους 10-15 cm και διαμέτρου 3-5 mm συλλέχθηκαν από τα δενδρύλλια Λεμονιάς Λαπήθου που ήταν προσβεβλημένα με τα ιοειδή CEVd και HSVd τα οποία διατηρούνται σε γλάστρες στο θερμοκήπιο. Αφού καθαρίστηκαν, προετοιμάστηκαν για

αποστείρωση με αφαίρεση των φύλλων και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C μέχρι να φυτευτούν στους σωλήνες.

Οι βλαστοί λεμονιάς Λαπήθου που χρησιμοποιήθηκαν για ιστοκαλλιέργεια είχαν μήκος 1-1,5 cm και έφεραν τουλάχιστον ένα οφθαλμό και αφού απολυμάνθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 20%, φυτεύτηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε σωλήνες με θρεπτικά υποστρώματα MS (Murashige & Skoog, 1962) ή Loyd and McCown (1980). Αρχικά 100 σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με σταθερά θερμοκρασία 22 °C και με την έκπτυξη των πρώτων φύλλων, 30 σωλήνες μεταφέρθηκαν σε άλλο θάλαμο με θερμοκρασία 10 °C, 30 σε άλλο θάλαμο με θερμοκρασία 4° C, ενώ οι υπόλοιποι συνέχισαν να επωάζονται στο θάλαμο με τους 22 °C για 5 βδομάδες. Διεξήχθηκε ιολογικός έλεγχος μεριστώματων μήκους 1-5 mm που αναπτύχθηκαν στους βλαστούς με την μέθοδο RT-PCR.

Άλλα μεριστώματα που αναπτύχθηκαν στους σωλήνες (Εικόνα 7.3) και υπέστησαν την θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών εμβολιάστηκαν σε υγρή σπορόφυτα Troyer *in vitro*. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές.



Εικόνα 7.3. Ανάπτυξη μεριστώματος στο σωλήνα

7.3.8. Μεταφύτευση ή επανεμβολιασμός των μικροεμβολιασμένων φυτών σε υγιή σπορόφυτα κιτρομηλιάς (*in vivo*).

Τα μικροφυτά που αναπτύχθηκαν στο σωλήνα, μεταφέρθηκαν σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία 20-25 C και φωτοπερίοδο 16 ωρών και εμβολιάστηκαν σε υγιή σπορόφυτα κιτρομηλιάς ηλικίας 6-9 μηνών. Επιπλέον, ορισμένα μικροεμβολιασμένα φυτά φυτεύτηκαν κατευθείαν σε γλάστρες με φυτόχωμα. Μετά από 3-6 μήνες και αφού αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά, μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο.

7.4. Αποτελέσματα

7.4.1. Μητρικά Δενδρύλλια για εξυγίανση

Χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα εξυγίανσης 4 ποικιλίες λεμονιάς, 3 ποικιλίες Μανταρινιάς, 5 ποικιλίες πορτοκαλιάς, τα είδη Περγαμόντ και Φράππα (Πίνακας 7.1) καθώς και 3 δενδρύλλια Μεξικανικής λιμετίας που ήταν προσβεβλημένα με τρεις απομονώσεις του ιού της τριστέζας. Τα δενδρύλλια αυτά εγκαταστάθηκαν σε εντομοστεγές δικτυοκήπιο στο ΙΓΕ για την λήψη των μεριστωμάτων και των βλαστών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

7.4.2. Ιολογικός έλεγχος

Κατά τον ιολογικό έλεγχο διαφάνηκε ότι όλα τα δενδρύλλια εκτός του ML ήταν προσβεβλημένα με ιοειδή, ενώ η πορτοκαλιά Νάβελ ήταν προσβεβλημένη και με τριστέζα (Πίνακας 7.2). Συγκεκριμένα η ποικιλία αυτή ήταν προσβεβλημένη με την σοβαρή απομόνωση CY ARI-5.

Τα 14 δενδρύλλια ήταν προσβεβλημένα με *Citrus exocortis viroid* (CEVd), πέντε δενδρύλλια ήταν προσβεβλημένα με *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), επτά δενδρύλλια ήταν προσβεβλημένα με *Hop stunt viroid* (HSVd), οκτώ δενδρύλλια ήταν προσβεβλημένα με *Citrus dwarfing viroid* (CDVd) και τρία δενδρύλλια ήταν προσβεβλημένα με *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd). Τα δενδρύλλια ήταν

προσβεβλημένα με ένα ή με συνδυασμό ιοειδών. Τρία από τα δενδρύλλια (21,42%), ήταν προσβεβλημένα μόνο με CEVd, ένα (7,14%) με CBVd και CEVd, δύο (14,28%) με HSVd και CEVd, δύο (14,28%) με HSVd, CEVd, και CDVd, τρία (21,42%) με CBVd, CDVd και CEVd, δύο (14,28%) με HSVd, CBCVd, CDVd και CEVd και ένα (7,14%) με όλα τα είδη ιοειδών (Πίνακας 7.2).

Το κάθε δενδρύλλιο ML ήταν προσβεβλημένο με μια απομόνωση του ιού της τριστεζας, την σοβαρή απομόνωση CY ARI-5, την ήπια απομόνωση CY ARI-24 και την πολύ ήπια CY ARI-7. Τα δενδρύλλια αυτά προήλθαν από άλλα δενδρύλλια ML που ήταν μολυσμένα με τις αντίστοιχες απομονώσεις του ιού. Στα αρχικά δενδρύλλια ML ο ιός της τριστεζας είχε μεταδοθεί με αφίδες *Aphis gossypii* (Κυριακού-Καπαρή, αδημοσίευτα στοιχεία).

7.4.3. Μικροεμβολιασμός *in vitro*

Μεριστώματα από όλα τα μητρικά δενδρύλλια μικροεμβολιάστηκαν *in vitro* σε σπορόφυτα Troyer ή Carrizo citrange με το ποσοστό επιτυχίας μικροεμβολιασμού να κυμαίνεται από 23 μέχρι 76% (Πίνακας 7.3). Από τα 445 μικροφυτά που εμβολιάστηκαν αναπτύχθηκαν τα 234. Το ψηλότερο ποσοστό επιτυχίας μικροεμβολιασμού καταγράφηκε για την Γιαφίτικη πορτοκαλιά, ενώ το χαμηλότερο για την πορτοκαλιά W. navel. Η επιτυχία μικροεμβολιασμού μεταξύ των ποικιλιών λεμονιάς κυμάνθηκε από 45 μέχρι 61,11 %, μεταξύ των ποικιλιών πορτοκαλιάς από 23 μέχρι 76%, μεταξύ των ποικιλιών μανταρινιάς από 36,36 μέχρι 52,77%, για τα Περγαμόντ ήταν 54,29%, για τις Φράμπες 50% και για τα ML από 47,50 μέχρι 54,16%.

7.4.4. Χημειοθεραπεία *in vitro*

Η ριμπαβιρίνη δοκιμάστηκε στις δόσεις 10, 20, 30, 40 και 50 mg/lit, ενώ ο μάρτυρας δεν περιείχε ριμπαβιρίνη.

Το ποσοστό επιβίωσης των μικροφυτών ήταν αντιστρόφως ανάλογο της ποσότητας ριμπαβιρίνης που περιείχε το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύχθηκε το μικροφυτό. Το ποσοστό επιβίωσης των μικροφυτών τα οποία δεν υπέστησαν χημειοθεραπεία κυμάνθηκε από 90 μέχρι 96%, ενώ των μικροφυτών που υπέστησαν

χημειοθεραπεία κυμάνθηκε από 20 μέχρι 93%. Συγκεκριμένα το ποσοστό επιβίωσης των μικροφυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 10 mg/lτ ριμπαβιρίνη κυμάνθηκε από 83 μέχρι 92%, των μικροφυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 10 mg/lτ ριμπαβιρίνη κυμάνθηκε από 83 μέχρι 92%, των μικροφυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 20 mg/lτ ριμπαβιρίνη κυμάνθηκε από 86 μέχρι 90%, των μικροφυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 30 mg/lτ ριμπαβιρίνη κυμάνθηκε από 70 μέχρι 73%, των μικροφυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 40 mg/lτ ριμπαβιρίνη κυμάνθηκε από 42 μέχρι 50 % και των μικροφυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 50 mg/lτ ριμπαβιρίνη κυμάνθηκε από 20 μέχρι 25%.

Το ποσοστό εξάλειψης του ιού της τριστέζας από τα μεριστώματα των μικροφυτών ήταν ανάλογο της ποσότητας ριμπαβιρίνης που περιείχε το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύχθηκε το μικροφυτό. Τα μεριστώματα που προέρχονταν από μικρόφυτα που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα που περιείχαν 0, 10 και 20 mg/lτ ριμπαβιρίνη ήταν προσβεβλημένα με τριστέζα, ενώ τα μεριστώματα που προέρχονταν από μικρόφυτα που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα που περιείχαν 30 mg/lτ ριμπαβιρίνη ήταν απηλλαγμένα από τον ιό σε ποσοστό 9, 12 και 14%. Τα μεριστώματα που προέρχονταν από μικρόφυτα που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα που περιείχαν 40 mg/lτ ριμπαβιρίνη ήταν απηλλαγμένα από τον ιό σε ποσοστό 72, 75 και 84%, ενώ τα μεριστώματα που προέρχονταν από μικρόφυτα που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα που περιείχαν 50 mg/lτ ribavirin ήταν απηλλαγμένα από τον ιό σε ποσοστό 100%.



Εικόνα 7.4. Ανάπτυξη μικροφύτων που υπέστησαν χημειοθεραπεία *in vitro*

Μεριστώματα που προέρχονταν από μικρόφυτα που υπέστησαν χημειοθεραπεία μικροεμβολιάστηκαν *in vitro* σε σπορόφυτα Troyer. Το ποσοστό επιτυχίας μικροεμβολιασμού κυμάνθηκε από 30 μέχρι 42% για τα μικρόφυτα που εμβολιάστηκαν με μεριστώματα που δεν υπέστησαν χημειοθεραπεία, ενώ για τα μικρόφυτα που υπέστησαν χημειοθεραπεία το ποσοστό επιτυχίας μικροεμβολιασμού κυμάνθηκε από 10 μέχρι 32%. Το χαμηλότερο ποσοστό επιτυχίας μικροεμβολιασμού παρουσιάστηκε στα μικροφυτά που προήλθαν από τα μεριστώματα που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα που περιείχαν την ψηλότερη δόση του ribavirin, 50 mg/l.



Εικόνα 7.5. Μεταφύτευση μικροεμβολιασμένων μικροφύτων εσπεριδοειδών στο χώμα

7.4.5 Θερμοθεραπεία

Τα μεριστώματα που προέρχονταν από τα δενδρύλλια που υπέστησαν θερμοθεραπεία στο θάλαμο σταθεράς θερμοκρασίας ήταν απηλλαγμένα από την CTV αλλά συνέχισαν να είναι προσβεβλημένα με CEVd.

7.4.6 Θερμοθεραπεία *in vitro*

Κατά τη θερμοθεραπεία *in vitro* το ποσοστό επιβίωσης των μικροφυτών ήταν αντιστρόφως ανάλογο της αύξησης της θερμοκρασίας και η επιβίωση στους 40 °C ήταν δύσκολη αφού τα περισσότερα μικροφυτά καταστράφηκαν μετά την έκθεσή τους στην υψηλή θερμοκρασία. Η εξυγίανση όμως επετεύχθη μετά από την επώαση των μικροφυτών στους 38 °C σε ποσοστό 15, 16 και 18% για 20 μέρες και στους 40 °C σε ποσοστό 100% για δύο μέρες.



Εικόνα 7.6. Ανάπτυξη μικροφύτων που υπέστησαν θερμοθεραπεία *in vitro*

7.4.7. Θεραπείας χαμηλών θερμοκρασιών

Τα πειράματα θεραπείας χαμηλών θερμοκρασιών που είχαν σαν στόχο την εξάλειψη των ιοειδών CEVd και HSVd από τα μεριστώματα λεμονιάς Λαπήθου είχαν σαν αποτέλεσμα την αδυναμία εξάλειψης των ιοειδών από τα μικρομοσχεύματα λεμονιάς που επώαστηκαν στους 10 °C για 5 εβδομάδες, καθώς και από τους μάρτυρες που ήταν μικρομοσχεύματα λεμονιάς που επώαστηκαν στους 22 °C. Αντίθετα, τα ιοειδή εξαλείφθηκαν από τα μικρομοσχεύματα λεμονιάς που επώαστηκαν στους 4 °C για 5 εβδομάδες. Μεριστώματα που αναπτύχθηκαν *in vitro* μετά την επώαση τους στις τρεις θερμοκρασίες μικροεμβολιάστηκαν σε σπορόφυτα Troyer. Το ποσοστό επιτυχίας μικροεμβολιασμού ήταν 49% για τα μεριστώματα που προήλθαν από τα μικρόφυτα που επώαστηκαν στους 10 °C, 45% για τα μεριστώματα που προήλθαν από τα μικρόφυτα που επώαστηκαν στους 4 °C και 48% για τα μεριστώματα που προήλθαν από τα μικρόφυτα που επώαστηκαν στους 22 °C (Σχήμα 7.2). Το ποσοστό επιτυχίας μικροεμβολιασμού για τη λεμονιά Λαπήθου ήταν μεγαλύτερο για τα μικρόφυτα που προήλθαν από μεριστώματα που παρήχθησαν στο δικτυοκήπιο (52.50%) σε σχέση με τα μικρόφυτα που παρήχθησαν *in vitro* (45-49%) και υποβλήθηκαν σε θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών. Το ποσοστό επιτυχίας μικροεμβολιασμού για το ML ήταν μεγαλύτερο για τα μικρόφυτα που προήλθαν από μεριστώματα που παρήχθησαν στο θερμοκήπιο

(47.50-54.96 %) σε σχέση με τα μικρόφουτα που παρήχθησαν *in vitro* και υπέστησαν χημειοθεραπεία (10-31%).

Πίνακας 7.1. Είδη και ποικιλίες εσπεριδοειδών που επιλέγηκαν για εξυγίανση

Είδος	Ποικιλία	Επιστημονικό όνομα
Λεμονιά	Αδαμοπούλου	Citrus limon (L.) Burm f. cv Adamopoulou
	Βέρνα	Citrus limon (L.) Burm f. cv Verna
	Λαπήθου	Citrus limon (L.) Burm f. cv Lapithou
	Πολύφορη	Citrus limon (L.) Burm f. cv Polyphori
Μανταρινιά	Clasuelina	Citrus reticulata cv. Clasuelina
	Page	Citrus reticulata cv. Page
	Αρακαπά	Citrus reticulata Blanco cv. Arakapas
Πορτοκαλιά	Navelina	Citrus sinensis cv. Navelina
	Washington navel	Citrus sinensis, cv. Washington navel
	Γιαφίτικη	Citrus sinensis, (L.) cv. Jaffa
	Σιεκέρικο	Citrus sinensis, acidless
	Αιματούσικη	Citrus sinensis var. sanguineum
Περγαμόντ		Citrus bergamia Risso & Poit
Φράππα		Citrus maxima (Burm.) Merrill
Λιμεττία	Μεξικανική λιμεττία	<i>Citrus aurantifolia</i> , <i>Christm. Swingle</i>

Πίνακας 7.2. Ιολογικός έλεγχος των ειδών και ποικιλιών εσπεριδοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για εξυγίανση

Είδος ή ποικιλία	Ιός				Ιοειδές				
	CPsV	CTV	CVV	CTLV	CBLVd	HSVd	CDVd	CBCVd	CEVd
Λ. Αδαμοπούλου					+		+		+
Λ. Verna					+		+		+
Λ. Λαπήθου						+			+
Λ. Πολύφορη						+			+
Clasuelina					+				+
Page					+		+		+
M. Αρακαπά						+	+		+
Navelina									+
Washington navel		+							+
Π. Γιαφίτικη						+	+	+	+
Σιεκέρικο									+
Αιματούσικη						+	+		+
Περγαμόντ					+	+	+	+	+
Φράππα						+	+	+	+
Mexican lime									+
Σύνολο	0	2	0	0	5	7	8	3	14

Πίνακας 7.3 Επίδραση θερμοθεραπείας *in vitro* στην επιβίωση και εξυγίανση μικροφύτων ML προσβεβλημένων με 3 απομονώσεις του ιού της τριστεζας

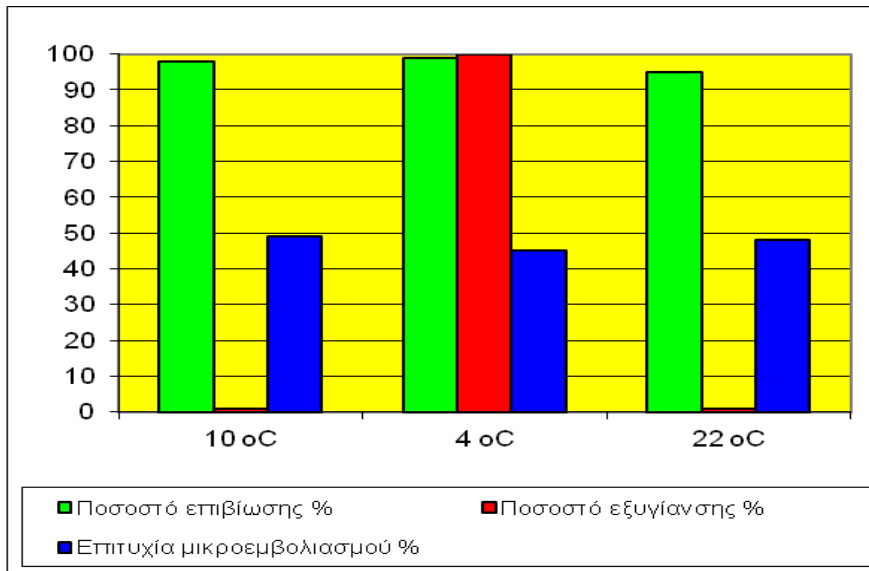
Θερμοκρασία	Μέρες	Επιβίωση μικροφυτών %			Εξυγίανση ιού τριστεζας %			Επιτυχία μικροεμβολιασμών%		
		CYARI -5	CYARI -24	CYAR I-7	CYARI -5	CYARI -24	CYARI -7	CYARI -5	CYARI -24	CYARI -7
22	80	95	100	92	0	0	0	5	49	51
30	20	87	87	80	0	0	0	-	-	-
35	20	80	75	67	0	0	0	-	-	-
38	20	55	55	54	15	18	16	-	-	-
40	2	10	11	10	100	100	100	0	0	0

Πίνακας 7.4. Επιτυχία μικροεμβολιασμού των ειδών και ποικιλιών εσπεριδοειδών με χρήση μεριστώματων από δικτυοκηπίο

Είδος ή ποικιλία	Αρ. Μικρο εμβολιασμών	Αρ. Νέων Μικροφυτών	Επιτυχία μικρ/σμού%	Αρ.Μετα φυτεύσεων	Αρ. υγιών φυτών
Λ. Αδαμοπούλου	40	18	45.00	7	2
Λ. Verna	7	4	57.14	2	1
Λ. Λαπήθου	40	21	52.50	9	6
Λ. Πολύφορη	18	11	61.11	6	3
Clasuelina	6	3	50.00	1	1
Page	11	4	36.36	2	1
Μ. Αρακαπά	36	19	52.77	15	9
Navelina	8	4	50.00	2	1
Washington navel	17	4	23.53	4	1
Π. Γιαφίτικη	42	32	76.19	30	22
Σιεκέρικο	10	5	50.00	1	1
Αιματούσικη	15	8	53.33	1	1
Περγαμόντ	35	19	54.29	15	3
Φράππα	20	10	50.00	8	1
ML CYARI-5	40	19	47.50	15	3
ML CYARI-24	52	27	51.92	21	8
ML CYARI-7	48	26	54.16	19	8
Σύνολο	445	234	52.58	158	72

Πίνακας 7.5. Επίδραση ριπαβιρίνης στην επιβίωση και εξυγίανση μικροφύτων ML προσβεβλημένων με 3 απομονώσεις του ιού της τριστεζας

ριπαβιρίνη mg/lt	Επιβίωση μικροφυτών %			Εξάλειψη του ιού της τριστεζας %			Επιτυχία μικροεμβολιασμών%		
	CYARI- 5	CYARI- 24	CYARI- 7	CYARI- 5	CYARI- 24	CYARI- 7	CYARI- 5	CYARI- 24	CYARI- 7
0	90	96	90	0	0	0	30	42	31
10	92	93	83	0	0	0	31	29	31
20	86	86	90	0	0	0	28	30	32
30	70	75	73	12	14	9	25	22	20
40	50	42	48	84	75	72	25	16	19
50	20	23	25	100	100	100	16	10	12



Σχήμα 7.2 Επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών *in vitro* για εξυγίανση μεριστωμάτων των ιοειδών CEVd και HSVd από βλαστούς λεμονιάς Λαπήθου

7.5. Συζήτηση

Ο μικροεμβολιασμός *in vitro* είναι η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται για εξυγίανση των εσπεριδοειδών από τις διάφορους ιούς και ιοειδή (Navarro *et al.*, 1975; Navarro, 1981; 1988; 1992). Η επιτυχία μικροεμβολιασμού εξαρτάται από την ποιότητα του μεριστώματος, την επιδεξιότητα του εμβολιαστή και την ταχύτητα εκτέλεσης του εμβολιασμού. Η ποιότητα του μεριστώματος έχει άμεση σχέση με την εποχή και τον τρόπο ανάπτυξης των φυτών-δοτών (Καπαρή-Ησαία, 2006). Το μέγεθος του ιστού που περιέχει το ακραίο μερίστωμα (καταβολές φύλλων και μερίστωμα) παίζει ρόλο στην επιτυχία μικροεμβολιασμού. Σε περιπτώσεις που ο ιστός αυτός είναι μεγαλύτερου μεγέθους (2-7 mm) η επιτυχία μικροεμβολιασμού είναι μεγαλύτερη. Όμως, αν ο ιστός αυτός έχει μικρότερο μέγεθος (1-1.5 mm) η επιτυχία παραγωγής υγιών φυτών είναι σε ποσοστό 100%, παρόλο που η επιτυχία μικροεμβολιασμού είναι μικρή (Navarro *et al.*, 1976).

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν οι μέθοδοι της χημειοθεραπείας και θερμοθεραπείας για εξυγίανση των μεριστωμάτων για τον ιό της τριστεζας πριν γίνει ο μικροεμβολιασμός, καθώς και η μέθοδος της θεραπείας χαμηλών θερμοκρασιών για εξυγίανση των ιοειδών CEVd και HSVd με κύριο στόχο την βελτιστοποίηση της μεθόδου του μικροεμβολιασμού με χρήση υγιών μεριστωμάτων μεγαλύτερου μεγέθους που θα επιτρέψουν την αύξηση των ποσοστών επιτυχίας μικροεμβολιασμού και εξυγίανσης.

Η θερμοθεραπεία δενδρυλλίων ML προσβεβλημένων με τριστεζα και δενδρυλλίων W. navel προσβεβλημένων με τριστεζα και το ιοειδές του εξωκόρτη μετά από επώαση στους 30-40 °C για 3 μήνες οδήγησε στην εξάλειψη του ιού της τριστεζας από τα ακραία μεριστώματα. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρει και ο Roistacher, 1977 για εξυγίανση των ιών της τριστεζας και της ψώρωσης μετά από θερμοθεραπεία 35-42 °C για 78-107 μέρες καθώς και οι Muhammad *et al.*, 2005, για εξυγίανση του ιού της τριστεζας σε σταδιακά αυξανόμενη θερμοκρασία από 30 °C μέχρι 40-50 °C για 4 εβδομάδες. Όμως, τα ιοειδή δεν εξαλείφτηκαν κατά την παρούσα εργασία με την θερμοθεραπεία. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την αναφορά των Calavan *et al.*, 1972, και των Vidalakis *et al.*, 2010, για την αδυναμία εξάλειψης των ιοειδών μετά από θερμοθεραπεία.

Η θερμοθεραπεία *in vitro* δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα, αφού η επιβίωση των μικροφυτών στους 40 °C όπου επιτυγχάνεται η εξάλειψη του ιού της τριστεζας, είναι πολύ μικρή και οι νέοι βλαστοί είναι καχεκτικοί με αποτέλεσμα να μην είναι κατάλληλα τα μεριστώματα για μικροεμβολιασμό.

Για εξυγίανση των ιοειδών δοκιμάστηκε η θεραπεία με χρήση χαμηλών θερμοκρασιών, μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε από τους El-Dougdoug *et al.*, 2010, για εξυγίανση του HSVd και παραγωγή υγιών φυτών ροδακινιάς και αχλαδιάς. Οι ερευνητές αυτοί, αφού δοκίμασαν την θερμοθεραπεία στους 37 °C για 3 βδομάδες με αρνητικά αποτελέσματα, πέτυχαν την εξυγίανση στους 4°C για 3 βδομάδες σε ποσοστό 18%, ενώ αύξησαν τα ποσοστά επιτυχίας με συνδυασμό χημειοθεραπείας με 20 mg/l ribavirin. Στην παρούσα εργασία, θετικά αποτελέσματα εξάλειψης των ιοειδών HSVd και CEVd από τα ακραία μεριστώματα έδωσε η επώαση μικροφύτων *in vitro* στους 4°C για 5 βδομάδες. Η θεραπεία με επώαση προσβεβλημένων με ιοειδή μικρομοσχευμάτων *in vitro* σε θερμοκρασία 4°C και ο μικροεμβολιασμός μεριστωμάτων που προέρχονται από αυτά σε υγιή σπορόφυτα επιτρέπει την εξυγίανση και την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού απηλλαγμένου από ιοειδή.

Για την παραγωγή νέων δενδρυλλίων με μικροεμβολιασμό απαιτείται περίοδος 3-5 χρόνια. Με συνδυασμό της θεραπείας χαμηλών θερμοκρασιών ο χρόνος αυτός αυξάνεται κατά 2-3 μήνες. Επιπλέον, αυξάνεται το κόστος παραγωγής, αφού χρησιμοποιούνται περισσότερα υλικά, ημερομίσθια κ.α., αλλά τα μικρά αυτά μειονεκτήματα δεν είναι απαγορευτικά για χρήση των δύο μεθόδων αφού το όφελος από την παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού είναι μεγάλο.

Η χρήση της χημειοθεραπείας και συγκεκριμένα της ριμπαβιρίνης αυξάνει το ποσοστό εξυγίανσης του πολλαπλασιαστικού υλικού που είναι προσβεβλημένο με τον ιό της τριστεζας, αλλά το μικρό ποσοστό επιβίωσης (20-25%) των νέων μικροφυτών που χρησιμοποιούνται σαν δότες μεριστωμάτων, καθώς και το μικρό ποσοστό επιτυχίας μικροεμβολιασμού (10-16%) δεν είναι ενθαρρυντικό για την ευρεία χρήση της μεθόδου.

Επιπρόσθετα, με την χρήση της ριμπαβιρίνης οι νέοι βλαστοί που εκπύχθηκαν ήταν καχεκτικοί, γεγονός που επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη του μεριστώματος και την επιτυχία μικροεμβολιασμού. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται και στην εργασία των Greco *et al.*, 1990, όπου αναφέρεται η παραγωγή πολλών μικρών βλαστών στα έκφυτα λιμεττίας που καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ριμπαβιρίνη.

Η επιτυχία μικροεμβολιασμού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος και την ποικιλία των εσπεριδοειδών.

Ο μικροεμβολιασμός παραμένει μια πολύ σημαντική μέθοδος για εξυγίανση των εσπεριδοειδών. Η εξυγίανση των φυτών από τον ιό της τριστέζας με συνδυασμό χημειοθεραπείας και μικροεμβολιασμού είναι εφικτή αλλά τα ποσοστά επιτυχίας δεν είναι ενθαρρυντικά σε σχέση με την εφαρμογή μόνο της μεθόδου του μικροεμβολιασμού. Για εξυγίανση της τριστέζας μπορεί να προηγηθεί του μικροεμβολιασμού η θερμοθεραπεία των δενδρυλλίων που θα χρησιμοποιηθούν σαν δότες μεριστωμάτων. Επιπλέον, για την εξυγίανση των ιοειδών, ο συνδυασμός της θεραπείας με χρήση χαμηλών θερμοκρασιών στους 4 °C για 5 εβδομάδες και μικροεμβολιασμού δίνει καλά αποτελέσματα.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Ο ιός της τριστέζας των εσπεριδοειδών (CTV) προκαλεί την πιο καταστροφική ιολογική ασθένεια των εσπεριδοειδών σε παγκόσμια κλίμακα. Μετά την εμφάνιση της το 1920 και την ευρύτερη διάδοση της σε πολλές χώρες παραγωγής εσπεριδοειδών, η ίωση έχει καταστρέψει περισσότερα από 85 εκατομμύρια δένδρα σε όλο τον κόσμο (Garnsey *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1994; Bar-Joseph *et al.*, 2010). Ξενιστές του ιού είναι όλα τα είδη εσπεριδοειδών και μερικά είδη *Passiflora* (Bar Joseph *et al.*, 1989) και φορείς μετάδοσης του είναι ορισμένα είδη αφίδων, κυρίως η *Toxoptera citricida* και η *Aphis gossypii*.

Ο ιός απαντάται σε διάφορες φυλές ή στελέχη οι οποίες προκαλούν διάφορα συμπτώματα στα δένδρα που προσβάλλουν. Οι ήπιες φυλές (CTV-M, mild), δεν προκαλούν συμπτώματα στα δένδρα ανεξάρτητα από την ποικιλία ή το υποκείμενο. Επίσης, προκαλούν ήπια ή καθόλου συμπτώματα στα φυτά δείκτες της μεξικανικής λιμεττίας. Οι μετρίως σοβαρές φυλές (CTV-D, decline), προκαλούν παρακμή σε δένδρα που είναι εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά (Lee and Brlansky, 1990). Οι σοβαρές φυλές (CTV-SP, stem pitting), προκαλούν βοθρίωση του ξύλου (Lee and Rocha –Pena, 1992; Bar-Joseph *et al.*, 1989). Σαν σοβαρές χαρακτηρίζονται και οι φυλές που προκαλούν ίκτερο των σποροφύτων (CTV-SY, seedlings yellow). Ο χαρακτηρισμός των φυλών είναι σημαντικός για την επιδημιολογία και αντιμετώπιση της ασθένειας (Garnsey *et al.*, 1987; Κυριακοπούλου, 1993).

Ο ιός προκαλεί τρεις ασθένειες ή σύνδρομα στα προσβεβλημένα δένδρα που έχουν σχέση με το είδος της φυλής του ιού.

A. την Παρακμή (Quick decline) σε ορισμένα είδη εσπεριδοειδών, όπως πορτοκαλιά (*Citrus sinensis*) και μανταρινιά (*Citrus reticulata*) εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά/νεραντζιά (*Citrus aurantium*).

B. την Βοθρίωση του ξύλου (stem pitting) σε δένδρα γκρέϊπφρουτ (*Citrus paradisi*), πόμελο, πορτοκαλιάς κ.ά. που συνδέεται με σοβαρή παρακμή του δένδρου. Θεωρείται η πιο σοβαρή ασθένεια της τριστέζας και μεταδίδεται αποτελεσματικά με την αφίδα *Toxoptera citricida*.

Γ. Τον Ίκτερο των σποροφύτων (seedlings yellows) σε δενδρύλλια κιτρομηλιάς, λεμονιάς (*Citrus limon*), και γκρέϊπφρουτ στο θερμοκήπιο.

Όταν ο ιός εγκατασταθεί σε μια περιοχή μπορεί να αντιμετωπιστεί με διάφορες μεθόδους που είναι ανάλογες με το είδος και την σοβαρότητα των φυλών του ιού, την σοβαρότητα των συμπτωμάτων, το έντομο φορέα μετάδοσης του ιού, το ποσοστό προσβολής κ.α. Στις περιπτώσεις όπου το ποσοστό προσβολής είναι χαμηλό (μικρότερο του 15%) και ο φορέας μετάδοσης είναι η αφίδα *Aphis gossypii* ή άλλες αφίδες που δεν μεταδίδουν αποτελεσματικά τον ιό, ο ιός αντιμετωπίζεται με εκριζώσεις των προσβεβλημένων δένδρων (eradication). Όταν το ποσοστό προσβολής είναι ψηλό (μεγαλύτερο του 15%), ο φορέας μετάδοσης δεν είναι η αφίδα *Toxoptera citricida* και το κύριο υποκείμενο που χρησιμοποιείται είναι η κιτρομηλιά, η τριστέζα μπορεί να αντιμετωπιστεί με αντικατάσταση της κιτρομηλιάς με άλλα ανεκτικά υποκείμενα όπως τα citranges κ.α. και χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Στις περιπτώσεις όμως που ο κύριος φορέας του ιού είναι η *Toxoptera citricida*, η οποία μεταδίδει πολύ αποτελεσματικά τις σοβαρές φυλές βοθρίωσης του ιού, η αντιμετώπιση μπορεί να γίνει με σταυροειδή προστασία.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια για δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με μεταφορά ανθεκτικών στην τριστέζα γονιδίων που υπάρχουν στην τρίφυλλη πορτοκαλιά (*Poncirus trifoliata*), αλλά φαίνεται ότι η δημιουργία ανεκτικών ποικιλιών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε εμπορική βάση είναι αρκετά δύσκολη και πιθανόν ο στόχος αυτός να είναι εφικτός μετά από 15-20 χρόνια (Lee and Keremane, 2013). Εξάλλου, διεξάγεται έρευνα για διερεύνηση της δυνατότητας προστασίας δενδρυλλίων μολυσμένων με τον ιό της τριστέζας μετά από εφαρμογή μεθόδου προστασίας που βασίζεται στην εφαρμογή dsRNA που θα προέρχεται από το ιικό γένωμα (Pena *et al.*, 2010).

Στην Κύπρο ο ιός της τριστέζας εισήχθηκε με μολυσμένα εμβόλια από τη Νότιο Αφρική το 1929, ανιχνεύτηκε το 1966 (Papasolomontos and Economides, 1968) και μετά την καταστροφή των προσβεβλημένων δένδρων επικράτησε η εντύπωση ότι η τριστέζα είχε εξαλειφθεί. Μετά όμως από περιορισμένη επισκόπηση που έγινε το 1986, εντοπίστηκε

τριστεζα σε 4 φυτείες στην επαρχία Αμμοχώστου και Λάρνακας (Kyriakou and Polycarrou, 1989; Kyriakou *et al.*, 1993). Από το 1992 άρχισε συστηματική επισκόπηση όλων των εσπεριδοειδών της Κύπρου με κύριο στόχο τον εντοπισμό και καταστροφή των προσβεβλημένων με τριστεζα δένδρων ή και φυτειών, όπου ήταν δυνατό, ούτως ώστε να παρεμποδιστεί η εξάπλωση της ασθένειας (Kyriakou *et al.*, 1993; Karari *et al.*, 2000). Η επισκόπηση αποτελούσε μέρος ενός ευρύτερου Σχεδίου για την αντιμετώπιση του ιού της τριστεζας στην Κύπρο που περιλαμβάνει παράλληλα και την παραγωγή και διάδοση ελεγμένου (virus tested) πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών (Kyriakou *et al.*, 2002).

Η επισκόπηση αφορούσε τις 5 επαρχίες της Κύπρου και το ποσοστό προσβολής των δένδρων με τριστεζα ήταν χαμηλό για τις τέσσερις επαρχίες και κυμαινόταν από 1,88 μέχρι 4,74%, ενώ για την επαρχία Αμμοχώστου ήταν ψηλό (17.4%). Επίσης, ψηλό ποσοστό προσβολής των δένδρων παρουσιάζεται και στην περιοχή Φασουρίου, Λεμεσού. Τα περισσότερα προσβεβλημένα δένδρα η/και φυτείες έχουν εκριζωθεί. Κύριο υποκείμενο εσπεριδοειδών στην Κύπρο είναι η Κιτρομηλιά (νεραντζιά). Πλεονεκτήματα της κιτρομηλιάς είναι η καλή παραγωγικότητα, η εξαιρετική ποιότητα καρπού, η ικανοποιητική προσαρμογή σε όλα τα εδάφη, η ανεκτικότητα στα άλατα και το ψηλό pH του εδάφους, στο ψύχος και την ξηρασία, η ανεκτικότητα σε διάφορα ιοειδή, στη κομμώση, στο blight κ.ά.

Με στόχο την εξεύρεση υποκειμένων ανεκτικών στην τριστεζα για να αντικαταστήσουν την κιτρομηλιά άρχισε τη δεκαετία του 1960, ειδικό πρόγραμμα αξιολόγησης υποκειμένων που περιλάμβανε αξιολόγηση όλων σχεδόν των εμπορικών ποικιλιών της Κύπρου καθώς και μερικών νέων (Economides 1976α; Economides 1976β; Economides 1977, Economides and Gregoriou 1992; Gregoriou and Economides 1993; Gregoriou and Economides 1994; Georgiou and Gregoriou 1999; Georgiou 2000α; Georgiou 2002; Georgiou 2004). Η αντικατάσταση της κιτρομηλιάς δεν είναι εύκολη αφού το υποκείμενο που θα την αντικαταστήσει πρέπει να είναι ανεκτικό και σε άλλους περιοριστικούς παράγοντες για τα εσπεριδοειδή στην Κύπρο και κυρίως στο ασβέστιο του εδάφους, στα ιοειδή και σε άλλες ασθένειες, καθώς και στην έλλειψη νερού, ενώ

ταυτόχρονα θα πρέπει να δίνει καλή παραγωγή και ποιότητα καρπού. Τα αποτελέσματα (Γεωργίου 2010) έδειξαν σαν υποσχόμενα τα υποκείμενα για τις κυπριακές συνθήκες τα Volkameriana, Cleopatra mandarin, Carrizo citrange και Troyer citrange.

Κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η περαιτέρω μελέτη του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο και η βελτιστοποίηση των τρόπων αντιμετώπισης της. Ειδικότεροι στόχοι της εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεζας και κατάταξη τους με βάση τα διεθνή πρότυπα, η αξιολόγηση των υποσχόμενων υποκειμένων εσπεριδοειδών ως προς την ανεκτικότητα τους σε σοβαρή κυπριακή απομόνωση του ιού, η μελέτη σταυροειδούς προστασίας από σοβαρή απομόνωση του ιού με χρήση άλλων ήπιων τοπικών απομονώσεων, η βελτιστοποίηση των τρόπων βιολογικής διάγνωσης και χαρακτηρισμού των απομονώσεων με χρήση *in vitro* μεθόδων και η βελτιστοποίηση των μεθόδων εξυγίανσης του πολλαπλασιαστικού υλικού.

Στα πλαίσια της εργασίας διεξήχθηκε βιολογικός και μοριακός χαρακτηρισμός 50 τοπικών απομονώσεων του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών που συνελέγησαν από προσβεβλημένες φυτείες από όλη την Κύπρο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό των ήπιων φυλών του ιού (58%) υπερτερεί σε σχέση με το ποσοστό των μετρίως σοβαρών (32%) και σοβαρών φυλών (10%). Οι ήπιες προκαλούν πολύ μικρές ή και καθόλου ζημιές στις εμπορικές φυτείες και επίσης μπορεί να είναι χρήσιμες καθώς προστατεύουν τα δένδρα μέσω σταυροειδούς προστασίας από ζημιές που προκαλούν άλλες σοβαρές φυλές του ιού. Οι σοβαρές φυλές του ιού προκαλούν συμπτώματα βοθρίωσης ή/και ικτέρου. Μεταξύ των 50 απομονώσεων καμιά δεν παρουσίασε συμπτώματα ικτέρου, ενώ συμπτώματα βοθρίωσης παρουσίασαν 5 απομονώσεις.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ευρεία διάδοση ποικίλων στελεχών στο νησί. Εικοσιτέσσερις απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν σε δύο φυλογενετικές ομάδες που περιλαμβάνουν ήπια στελέχη από την Πορτογαλία και την Ισπανία, ενώ δέκα άλλες κατατάχθηκαν στην ομάδα με στελέχη μέτριας σοβαρότητας από τη Μέση Ανατολή. Οι υπόλοιπες απομονώσεις χαρακτηρίζονται ως σοβαρές και κατατάσσονται στις ομάδες

που περιλαμβάνονται στελέχη από την Αμερική και την Αφρική, τα οποία έχουν καταγραφεί να σχετίζονται με συμπτώματα ταχείας παρακμής και αποπληξίας. Δέκα από τις απομονώσεις που μελετήθηκαν φαίνεται ότι εντάσσονται σε μια νέα ομάδα μαζί με στελέχη από το Ισραήλ και τη Συρία με μέτρια σοβαρότητα. Σημειώνεται ότι στην προηγούμενη μελέτη που είχε γίνει για το χαρακτηρισμό 12 απομονώσεων από την Κύπρο (Parayiannis *et al.*, 2007), δεν είχαν εντοπιστεί απομονώσεις που να κατατάσσονται στη συγκεκριμένη ομάδα. Τα αποτελέσματα δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για την παρουσία ήπιων και σοβαρών στελεχών του ιού στην Κύπρο. Η παρουσία στελεχών που προκαλούν ταχεία ξήρανση και παρακμή κρίνεται ως εξαιρετικά ενδιαφέρουσα και σημαντική εξαιτίας της ευρείας χρήσης του ευπαθούς υποκειμένου της νερατζιάς στη νήσο.

Για διερεύνηση της δυνατότητας διενέργειας βιολογικού χαρακτηρισμού εκτός θερμοκηπίου με στόχο την επιτάχυνση της εργασίας χρησιμοποιήθηκε ο φυτοδείκτης της μεξικανικής λιμεττίας για μελέτη της μορφογένεσης μικροφυτών *in vitro* που παρήχθησαν από 4 απομονώσεις προσβεβλημένες με σοβαρή τοπική απομόνωση του ιού της τριστέζας, μετρίως σοβαρή απομόνωση, ήπια απομόνωση και μια πολύ ήπια. Η ανάπτυξη των μικροφυτών της μεξικανικής λιμεττίας παρουσίασε διαφοροποίηση ως προς την κάθε απομόνωση του ιού με τις σοβαρές απομονώσεις να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις ήπιες και τους υγιείς μάρτυρες. Οι ήπιες απομονώσεις είχαν ομοιότητες με την ανάπτυξη των υγιών μαρτύρων.

Ο *in vitro* βιολογικός χαρακτηρισμός του ιού της τριστέζας σε σχέση με τον βιολογικό χαρακτηρισμό στο θερμοκήπιο υστερεί ως προς την ακρίβεια εκδήλωσης των συμπτωμάτων και κατάταξη των απομονώσεων σε σχέση με τα συμπτώματα που προκαλούν στα 5 φυτά δείκτες. Όμως η εργασία στο θερμοκήπιο είναι πολύ χρονοβόρα και επίπονη αφού χρειάζονται 24-34 μήνες, ενώ με την *in vitro* μέθοδο τα αποτελέσματα είναι ταχύτερα και χρειάζονται μόνο ένα μήνα. Η *in vitro* μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για γρήγορο βιολογικό διαχωρισμό των σοβαρών από τις ήπιες φυλές του ιού.

Η βιολογική διάγνωση του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών είναι απαραίτητη στα προγράμματα πιστοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού με βάση την ευρωπαϊκή και τοπική νομοθεσία. Ο χρόνος που απαιτείται για την διάγνωση του ιού με την γνωστή κλασική μέθοδο των φυτών δεικτών είναι μεγάλος (2-12 μήνες από την στιγμή της μόλυνσης) και η διαδικασία επίπονη. Η νέα *in vitro* μέθοδος για επιτάχυνση της ανίχνευσης του ιού της τριστεζας στα εσπεριδοειδή που αναπτύχθηκε κατά την παρούσα μελέτη, και η οποία αποτελεί συνδυασμό της βιολογικής διαγνωστικής μεθόδου χρήσης του φυτοδείκτη της μεξικανικής λιμεττίας και της μεθόδου του μικροεμβολιασμού σε σωλήνα, μπορεί να αντικαταστήσει την κλασική μέθοδο του θερμοκηπίου και να δώσει αποτελέσματα σε 20-30 μέρες. Κυριότερα πλεονεκτήματα της νέας μεθόδου σε σύγκριση με την κλασική βιολογική μέθοδο διάγνωσης είναι η ταχύτητα διάγνωσης, η οικονομία και η αξιοπιστία.

Το υποκείμενο που χρησιμοποιείται για εμβολιασμό των εσπεριδοειδών στην Κύπρο είναι κυρίως η νεραντζιά. Έξι υποκείμενα εσπεριδοειδών, τα Carrizo citrange, Swingle citrumelo, Volkameriana lemon, Gou Tou, Cleopatra mandarin και νεραντζιά (Sour Orange) αξιολογούνται για ανεκτικότητα στον ιό της τριστεζας στον Πειραματικό Σταθμό Ξυλοτύμπου του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών. Τα δενδρύλλια που είναι εμβολιασμένα με την ποικιλία πορτοκαλιάς Washington navel εγκαταστάθηκαν το 2004. Φυτεύτηκαν 24 δενδρύλλια από κάθε υποκείμενο από τα οποία τα μισά είχαν μολυνθεί τεχνητά με την τοπική σοβαρή απομόνωση CYARI 5 του ιού της τριστεζας. Ο ιός μεταδόθηκε κατά το δέκατο έτος σε δύο υγιή δένδρα, ενώ κατά το επόμενο έτη ο ιός δεν μεταδόθηκε περαιτέρω. Συμπτώματα νανισμού, ξήρανσης κλαδίσκων και φυλλόπτωσης παρουσιάστηκαν στα περισσότερα από τα δένδρα που ήταν εμβολιασμένα σε υποκείμενα Swingle citrumelo. Τα υπόλοιπα υποκείμενα δεν παρουσίασαν οποιοδήποτε σύμπτωμα στα ηλικίας 12 ετών δένδρα (Καπαρή-Ησαία κ.α. 2014). Αξιοσημείωτο είναι ότι ακόμα και τα δένδρα που είναι εμβολιασμένα στην νεραντζιά δεν παρουσίασαν κανένα σύμπτωμα και είναι παραγωγικά με πολύ καλή ποιότητα καρπού. Πιθανόν, η μη εκδήλωση συμπτωμάτων στα δένδρα που είναι προσβεβλημένα με σοβαρή τοπική φυλή του ιού στο 12^ο έτος της ηλικίας τους να έχει σχέση με τις πολύ ψηλές θερμοκρασίες, μεγαλύτερες των 40^ο C που επικρατούν στο νησί για 3-4 μήνες το χρόνο οι οποίες

φαίνεται ότι λειτουργούν προστατευτικά. Όμως σε επίσκεψη μας σε φυτεία του Φασουρίου, διαπιστώσαμε σοβαρά συμπτώματα βοθρίωσης του ξύλου που επέφεραν ξήρανση νεαρών δενδρυλλίων ηλικίας 3-5 ετών από υλικό που προήλθε από την Ισπανία και εμβολιάστηκε σε υποκείμενα *Macrophylla*.

Η εξυγίανση πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών γίνεται σήμερα στις χώρες καλλιέργειας εσπεριδοειδών, κυρίως με εφαρμογή της μεθόδου του μικροεμβολιασμού. Η εφαρμογή της μεθόδου αυτής και στην Κύπρο (Ioannou et al., 1991; Karari-Isaia et al., 2002; Karari-Isaia et al., 2004; Καπαρή-Ησαία κ.ά. 2005β) είναι πολύ σημαντική τόσο για την αντιμετώπιση των ιολογικών ασθενειών, και ειδικότερα της τριστεζας, όσο και για την αναβάθμιση του ντόπιου γενετικού υλικού εσπεριδοειδών.

Ο μικροεμβολιασμός παραμένει μια πολύ σημαντική μέθοδος για εξυγίανση των εσπεριδοειδών. Στα πλαίσια της εργασίας αυτής μελετήθηκε η δυνατότητα εξυγίανσης της τριστεζας με συνδυασμό χημειοθεραπείας και μικροεμβολιασμού που φάνηκε να είναι εφικτή, αλλά τα ποσοστά επιτυχίας δεν είναι ενθαρρυντικά σε σχέση με την εφαρμογή μόνο της μεθόδου του μικροεμβολιασμού. Για εξυγίανση της τριστεζας μπορεί να προηγηθεί του μικροεμβολιασμού η θερμοθεραπεία των δενδρυλλίων που θα χρησιμοποιηθούν σαν δότες μεριστωμάτων. Επιπλέον, για την εξυγίανση των ιοειδών, ο συνδυασμός της θεραπείας με χρήση χαμηλών θερμοκρασιών στους 4 °C για 5 εβδομάδες και μικροεμβολιασμού δίνει καλά αποτελέσματα (Καπαρή-Ησαία κ.α. 2014).

Από τα πιο πάνω και με δεδομένο την απουσία της *Toxoptera citricida*, του κύριου φορέα μετάδοσης σοβαρών φυλών βοθρίωσης του ιού, καταδεικνύεται ότι ο ιός της τριστεζας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο μπορεί να αντιμετωπιστεί σήμερα με τους πιο κάτω τρόπους:

1. Με εκριζώσεις των ιωμένων δένδρων ή/και φυτειών (eradication) όταν το ποσοστό προσβολής είναι χαμηλό, μικρότερο του 5%.
2. Χρήση ελεγμένου και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού
3. Αποφυγή επανεμβολιασμού προσβεβλημένων δένδρων

4. Αποφυγή χρήσης εμβολίων από δένδρα που δεν είναι ελεγμένα και μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί φορείς ιώσεων
5. Αποφυγή διακίνησης εμβολίων από την μια φυτεία στην άλλη και ειδικά από την επαρχία Αμμοχώστου και περιοχή Φασουρίου Λεμεσού όπου το ποσοστό προσβολής είναι ψηλό
6. Καταπολέμηση των αφίδων-φορέων
7. Αποφυγή εισαγωγής μολυσμένων εμβολίων από ξένες χώρες.
8. Σε περιπτώσεις εισαγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού από άλλες χώρες να γίνεται έλεγχος και στην Κύπρο και μετά να εγκαθίσταται στις φυτείες
9. Αντικατάσταση του υποκειμένου της νεραντζιάς σε περιπτώσεις περιοχών με μεγάλη προσβολή τριστέζας και κατάλληλες εδαφοκλιματολογικές συνθήκες για τα νέα υποκείμενα

Σε περίπτωση όμως που τα σημερινά δεδομένα αλλάξουν και εισαχθεί στο νησί ο κύριος φορέας του ιού, η *Toxoptera citricida*, η αντιμετώπιση δεν θα μπορεί να γίνει με τους πιο πάνω τρόπους, αλλά θα πρέπει να αντιμετωπιστεί με σταυροειδή προστασία με χρήση ήπιων απομονώσεων του ιού όπως συμβαίνει και σε άλλες χώρες. Τα ανεκτικά υποκείμενα δεν παρέχουν προστασία για σοβαρές φυλές που προκαλούν βοθρίωση του ξύλου.

Οι ήπιες απομονώσεις που μπορεί να δράσουν σαν προστατευτικές μπορεί να προέλθουν από επιλογή ήπιων τοπικών απομονώσεων που παρουσιάζουν ήπια αντίδραση στη μεξικανική λιμεττία και που όταν συνδυαστούν με σοβαρές απομονώσεις παρέχουν προστασία στα δενδρύλλια (Roistacher *et al.*, 2010).

Κατά την μελέτη αυτή έγινε προσπάθεια εφαρμογής της μεθόδου αυτής στο θερμοκήπιο. Τα αποτελέσματα αυτά που καταγράφηκαν κατά την εφαρμογή των προκαταρκτικών αυτών πειραμάτων με χρήση των δύο ήπιων τοπικών απομονώσεων του ιού της τριστέζας CY ARI-7 και CY ARI-24, είναι ενθαρρυντικά για σταυροειδή προστασία

δενδρυλλίων Washington navel εμβολιασμένα σε κιτρομηλιά από μετέπειτα προσβολή με την σοβαρή απομόνωση CY ARI-5. Όμως, για να είναι πιο αξιόπιστα τα αποτελέσματα πρέπει το πείραμα να διεξαχθεί υπό συνθήκες αγρού. Αργότερα, οι ήπιες απομονώσεις πολλαπλασιάστηκαν σε νέα δενδρύλλια μεξικανικής λιμεττίας ώστε να υπάρξει η δυνατότητα μελλοντικής χρήσης τους. Επιπρόσθετα, πολλαπλασιάστηκαν *in vitro*, για περαιτέρω διαφύλαξη τους.

Η λειτουργία Προγραμμάτων εξυγίανσης πολλαπλασιαστικού υλικού είναι, όπως είδαμε και πιο πάνω, απαραίτητη για την αντιμετώπιση των ιολογικών και συναφών ασθενειών που προκαλούν πολλά και καταστροφικά προβλήματα στις καλλιέργειες (Navarro *et al.* 2001).

Η ύπαρξη του ιού της τριστέζας στο νησί (Kyriakou *et al.*, 2002, Καπαρή-Ησαΐα κ.ά. 2005α) έδωσε το έναυσμα για λήψη αυστηρών μέτρων αντιμετώπισης των ιώσεων κατά το πρότυπο άλλων χωρών (Navarro, *et al.* 2001), κυριότερο των οποίων είναι η δημιουργία Προβασικής Φυτείας για διαφύλαξη του ελεγμένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Η ανάγκη για χρήση υγιούς υλικού καθίσταται πιο επιτακτική σε περίπτωση αντικατάστασης του υποκειμένου της νεραντζιάς που χρησιμοποιείται σήμερα και είναι ευπαθές στην τριστέζα, με άλλα υποκείμενα ανεκτικά στην τριστέζα, αλλά ευπαθή στον εξωκόρτη και άλλα ιοειδή (Roistacher, *et al.* 1995), τα οποία είναι διαδεδομένα στην Κύπρο σε ποσοστό 90% των εσπεριδοειδών (Kyriakou, 1992).

Η διακίνηση πολλαπλασιαστικού υλικού από μια χώρα σε άλλη, που είναι επιθυμητή για την απόκτηση νέων εμπορικών ποικιλιών, εμπεριέχει τον κίνδυνο εισαγωγής νέων ανεπιθύμητων εχθρών και ασθενειών. Τα παραδείγματα εισαγωγής εχθρών και ασθενειών από άλλες χώρες είναι πολλά και οι συνέπειες καταστροφικές, τόσο από οικονομικής όσο και από περιβαλλοντικής πλευράς. Η διακίνηση του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών μέσω του πολλαπλασιαστικού υλικού και η εισαγωγή του σε χώρες αμόλυντες αποτελεί ένα κλασσικό παράδειγμα.

Με τον τρόπο αυτό η τριστέζα εισήχθη και στην Κύπρο από τη Ν. Αφρική καθώς και στην Ελλάδα από την Ισπανία (Dimou *et al.*, 2002). Η δυνατότητα εισαγωγής πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού από χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, που είναι εφικτή μετά την ένταξη της Κύπρου στην Ε.Ε., εμπεριέχει τον κίνδυνο εισαγωγής της τριστέζας κάτι που έγινε πρόσφατα και στην Ελλάδα. Η Ελλάδα ήταν απαλλαγμένη από τριστέζα μέχρι το 1994 που έγινε εισαγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού από την Ισπανία (Dimou *et al.*, 2002; Κυριακοπούλου, 1999). Η παράνομη εισαγωγή «πιστοποιημένου» πολλαπλασιαστικού υλικού νέων ποικιλιών εσπεριδοειδών που τελικά αποδείχθηκε μολυσμένο με τριστέζα, είχε σαν αποτέλεσμα την καταστροφή και των νέων ποικιλιών αλλά και άλλων δένδρων που μολύνθηκαν απ'αυτές.

Ο τρόπος εισαγωγής της τριστέζας στην Ελλάδα πρέπει να ευαισθητοποιήσει όλους όσους ασχολούνται με τα εσπεριδοειδή στην Κύπρο. Στην περίπτωση της Κύπρου υπάρχει ο κίνδυνος εισαγωγής νέων φυλών του ιού που ίσως είναι πιο σοβαρής μορφής και κατά συνέπεια περισσότερο επικίνδυνες από τις τοπικές φυλές του ιού. Αν διαφοροποιηθεί η σημερινή κατάσταση όπου η τριστέζα βρίσκεται υπό έλεγχο, είτε με εισαγωγές πολλαπλασιαστικού υλικού μολυσμένου με επικίνδυνες φυλές τριστέζας από άλλες χώρες, είτε με εισαγωγή του εντόμου φορέα *Toxoptera citricida*, του αποτελεσματικότερου φορέα του ιού, η αντιμετώπιση της τριστέζας θα καταστεί εξαιρετικά δύσκολη και οι συνέπειες για την εσπεριδοκαλλιέργεια θα είναι δραματικές.

Με την ένταξη της Κύπρου στην Ευρωπαϊκή Ένωση και την φιλελευθεροποίηση του εμπορίου, ο κίνδυνος εισαγωγής εχθρών και ασθeneιών είναι μεγαλύτερος. Υπάρχουν πολλοί εχθροί και ασθένειες καταστροφικοί για τα εσπεριδοειδή που σήμερα δεν υπάρχουν στον τόπο μας, από τους οποίους η εσπεριδοκαλλιέργεια πρέπει να διαφυλαχθεί. Ο κίνδυνος εισαγωγής του εντόμου *Toxoptera citricida* που είναι φορέας σοβαρής μορφής φυλών του ιού της τριστέζας είναι υπαρκτός, αφού βρίσκεται ήδη στην Πορτογαλία και την Ισπανία. Άλλες σοβαρές ασθένειες των εσπεριδοειδών που δεν υπάρχουν στην Κύπρο είναι η ασθένεια Greening (*Liberobacter spp*), Citrus canker (*Xanthomonas campestris*), το Blight (αγνώστου αιτιολογίας), η ίωση Tatter leaf virus, το

βακτήριο *Xylella phastidiosa* που προκαλεί την ασθένεια *Citrus variegated chlorosis*, καθώς και νέες φυλές τριστέζας σοβαρής μορφής.

Η εισαγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού πρέπει να γίνεται μέσω της νόμιμης οδού, με πολλή προσοχή και λήψη όλων των φυτοπροστατευτικών μέτρων από τις αρμόδιες υπηρεσίες του κράτους.

Με την ανάπτυξη της τεχνικής του μικροεμβολιασμού στην Κύπρο, υπάρχει η ευκαιρία εισαγωγής του πολλαπλασιαστικού υλικού από άλλες χώρες, με μοσχεύματα *in vitro* τα οποία θα υποβληθούν σε μεριστωματική καλλιέργεια ώστε να εξυγιανθούν και να πολλαπλασιαστούν ώστε το υλικό της επιθυμητής ποικιλίας να είναι υγιές για να αποφευχθούν προβλήματα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται και σε άλλες χώρες όπως η Ισπανία, ΗΠΑ., Καναδάς κ.ά. (Navarro *et al.*, 1991; Sarbagh *et al.*, 2001).

Τα αποτελέσματα της διατριβής κατέδειξαν τον βαθμό σοβαρότητας της ασθένειας σε σχέση με την διερεύνηση των φυλών του ιού που υπάρχουν στο νησί και έδωσαν την δυνατότητα συλλογής ήπιων τοπικών απομονώσεων του ιού, οι οποίες θα είναι πολύτιμες για μελλοντική αντιμετώπιση της ασθένειας σε περίπτωση εισόδου της *Toxoptera citricida*. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη μεθόδων για σύντομη διάγνωση και εξυγίανση δίνουν εργαλεία για αρτιότερη αντιμετώπιση του ιού της τριστέζας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas M., Khan M.M., Fatima B., Iftikhar Y., Mughal S.M., Jaskani M.J., Khan I.A., and Abbas H. (2008). Elimination of *Citrus Tristeza Closterovirus* (CTV) and production of certified citrus plants through shoot-tip micrografting. *Pakistan J. Botany* 40, 1301-1312.
- Adams A. N., Barbara D. J., Morton A., and Darby P. (1996). The experimental transmission of *hop latent viroid* and its elimination by low temperature treatment and meristem culture. *Annals of Applied Biology* 128, 37-44.
- Ballester-Olmos J.F., Pina J.A., Carbonell E.A., Moreno P., Hermoso de Mendoza A., Cambra M. and Navarro L. (1993). Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology* 42, 219-229.
- Barbosa C. J. , Pina J. A., Pérez-Panadés J., Bernad L., Serra P., Navarro L., and Duran-Vila N. (2005). Mechanical Transmission of Citrus Viroids. *Plant Disease* 89, 749-754.
- Bar-Joseph M., Garnsey S.M., Gonsalves D., Moscovitz Purcifull M., Clark M.F., and Loebenstein G. (1979). The Use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of *Citrus Tristeza Virus*. *Phytopathology*. 69, 190-194.
- Bar-Joseph M., Garnsey S.M., Gonsalves D., Purcifull D.E. (1980). Detection of *Citrus Tristeza Virus* by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and SDS-immunodiffusion methods. Proceedings 8th Conference International Organisation Citrus Virologists. IOCV. 1-16.
- Bar-Joseph M., Roistacher C.N., Garnsey S.M., and Gumpf D.J. (1981). A review on tristeza, an ongoing threat to citriculture. *Proceedings of International Society of Citriculture* 1, 419-423.
- Bar-Joseph M., Marcus R. M., and Lee R. F. (1989). The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology* 27, 291-316.
- Bar-Joseph M. and Hadjinicolis A. (1994). Sensitive detection of *Citrus tristeza virus* by dipping and incubation of stem segments in ELISA wells. *Hassadeh* 74:76 (Hebrew with English abstract).
- Bar-Joseph M., Che X., Mawassi M., Gowda S., Satyanarayana T., Ayllon A.M., Albiach-Marti R.M., Garnsey S.M., and Dawson W.O. (2002). The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* molecular research. Proceedings 15th Conference International Organisation Citrus Virologists. IOCV. 1-7.

- Bar-Joseph M., Batuman O., and Roistacher C.N. (2010). The History of *Citrus tristeza virus*-revisited. In: Karasev A.V. and Hilf M. *Citrus tristeza virus- Complex and Tristeza Diseases*. APS Press. USA (ISBN 978-0-89054-378-8) p. 3-26.
- Bederski K., Roistacher C.N. and Muller G.W. (2005). Cross Protection against the severe *Citrus tristeza virus* stem pitting in Peru. Proceedings 16th *Conference International Organisation Citrus Virologists*. IOCV, pp. 117-126.
- Bitters W.P.T, Murashige T., Rangan T.S., and Nauer E. (1972). Investigations on establishing virus-free citrus plants through tissue culture. Proceedings, 5th *Conference International Organisation Citrus Virologists*. IOCV, pp. 267-271.
- Bove M.J. (2006). "Huanglongbing: A Destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus". *Journal of Plant Pathology* 88(1), 7-37.
- Bove M.J. and Ayres A.J. (2007). Etiology of three recent diseases of citrus in Sao Paulo State: Sudden Death, Variegated Chlorosis and Huanglongbing. *IUBMB Life*, 59: 346-354.
- Boxus Ph. (1998). Plant Biotechnology applied to Horticultural Crops. *Proceedings of World Conference on Horticultural Research*. Rome. 1-14.
- Brlansky R.H., Timmer L.W., Lee R.F., and Graham J.H. (1984). Relationship of xylem plugging to reduced water uptake and symptom development in citrus trees with blight and blightlike declines. *Phytopathology* 74, 1325-1328.
- Broadbent P., Bevington K.B., and Coote B.G. (1991). Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection. *Proceedings, 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 64-70.
- Broadbent P., Dephoff C.M., Franks N., Gillings M., and Industo J. (1995). Pre-immunization of grapefruit with a mild protective isolate of *Citrus tristeza virus* in Australia. *Proceedings, 3rd International Workshop on Citrus tristeza virus and Brown citrus aphid in Central America and the Caribbean*, pp.163-168.
- Broadbent P., Brlansky and Indsto J. (1996). Biological characterization of Australian isolates of *Citrus tristeza virus* and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease* 80, 329- 333.
- Broembsen Von L. and Lee A.T.C. (1988). South Africa's citrus improvement programme. *Proceedings, 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 407-416.
- Calavan, E.C., C.N. Roistacher, and E.M. Nauer. (1972). Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. *Plant Disease*. 56, 976-980.

- Calavan E.C., Harjung M.K., Blue R.L., Roistacher C.N., Gumpf D.J., and Moore P.W. (1980). Natural spread of seedling yellows and sweet orange and grapefruit stem pitting tristeza viruses at the University of California, Riverside. *Proceedings, 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 69-75.
- Cambra M., Garnsey S.M., Permar T.A., Henderson C.T., Gumpf D., and Vela C. (1990a). Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology* 80, 1034.
- Cambra M., Camarasa E., Gorris M.T., Garnsey S.M. and Carbonell E. (1990b). Comparison of different immunosorbent assays of *Citrus tristeza virus* (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. *Proceedings, 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 38-45.
- Cambra M., Gorris M.T., Roman M.P., Terrada E., Camarasa E., Olmos A., and Colomer M. (2000). Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. *Proceedings, 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 34-41.
- Cambra M., Gorris M.T., Olmos A., Martinez M.C., Roman M.P., Bertolini E., Lopez A., and Carbonell E.A. (2002). European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in Adult Trees. *Proceedings, 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 69-77.
- Clark, M.F. and A.M., Adams. (1977). Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Cohen, O., Batuman, O., Moskowits, Y., Rozov, A., Gootwine, E., Mawassi, M., and Bar-Joseph, M. (2005). "Goat-Horns: Platforms for Viroid Transission to Fruit Trees?" *Phytoparasitica*. 33, pp.141-148.
- Costa A.S and Muller G.W. (1980). Tristeza control by cross protection: a US-Brazil cooperative success. *Plant Disease* 73, 538-541.
- da Graça J. V, van Vuuren S. P. (2010). "Managing *Citrus tristeza virus* losses using cross protection," In: Karasev A.V. and Hilf M. *Citrus tristeza virus- Complex and Tristeza Diseases*. APS Press. USA (ISBN 978-0-89054-378-8), p. 247-260.
- Davies F.S. and Albrico L.G. (1994). Citrus. CAB International, U.K.p. 87-101 and 189-201.
- Dawson O.W. (2010). *Molecular Genetics of Citrus tristeza virus*. In: Karasev A.V. and Hilf M. *Citrus tristeza virus- Complex and Tristeza Diseases*. APS Press. USA (ISBN 978-0-89054-378-8), p. 53-73.

- Dimou, D., Drosopoulou J., Moschos E., Spanou C., and Dermatas P. (2002). First Report of *Citrus tristeza virus* in Greece. Proceedings, 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, pp. 78-82.
- D'Onghia A.M. (2009). The CIHEAM-Mediterranean Research Network on Certification of Citrus (MNCC): the regional programme for the control of *Citrus tristeza virus* and its major vector *Toxoptera citricidus* in the Mediterranean. *Options Mediterraneennes*, Serie B/no 65, p. 9.
- Dodds Allan J. (1994). *Citrus tristeza virus* Incidence in the Central Valley: Progress toward eradication. *Citrograph*, p. 12-20.
- Duran-Vila, N., Pina, A., Ballester, J.F., Juarez, J., Roistacher, C.N., Bustamante-Rivera, R. and Semancik, J.S. (1988). "The *Citrus Exocortis* Disease: A Complex of Viroid-RNAs". *Proceedings 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 152-164.
- Duran-Vila, N., Cambra, M., Medina, V., Ortega, C., and Navarro, L. (1989). "Growth and Morphogenesis of citrus tissue cultures infected with *Citrus tristeza virus* and *Citrus infectious variegation virus*". *Phytopathology* 79, 820-826.
- Duran-Vila, N., Medina, V., Pina, J.A., Ortega, C., Molins, M.I. and Navarro, L. (1991). "Growth and Morphogenesis of citrus tissue cultures infected with *Psorosis*, Vein enation, and Cachexia". *Phytopathology* 81, 824-831.
- Economides C.V. (1976 a). Performance of March Seedless grapefruit on six rootstocks in Cyprus. *Journal of Horticultural Science*, 51, 393-400.
- Economides C.V. (1976 β). Growth and Productivity of "Washington" Navel orange trees on six rootstocks in Cyprus. *Horticultural Research*, 16, 83-88.
- Economides C.V. (1977). The influence of rootstocks on tree growth, yield and fruit quality of Valencia oranges in Cyprus. *Journal of Horticultural Science*, 52, 29-36.
- Economides C.V. and Gregoriou C. (1992). Growth, Yield, and Fruit Quality of Nucellar Frost 'Marsh' Grapefruit on Fifteen Rootstocks in Cyprus. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 118, 326-329.
- El-DougDoug Kh.A., M.E. Osman, H.S. Abdelkader, R.A. Dawoud, R.M. Elbaz (2010). Elimination of Hop stunt viroid (HSVd) from infected peach and pear plants using cold therapy and chemotherapy *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 4 pp. 54-60.
- EPPO Standards. (2005). Certification Schemes Pathogen-Tested citrus trees and rootstocks PM 4/12(1). *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, Paris, France, 12 pages.

- Facioli G. and Marani F. (1998). Virus elimination by Meristem Tip Culture and Tip Micrografting. In: *Plant virus disease control* (Hadidi A, Khetarpal RH, Koganezawa H, eds), APS Press, St. Paul, (USA). *Plant Virus Disease Control*. pp. 346-380.
- Folimonova S. (2013) Developing an understanding of cross-protection by *Citrus tristeza virus*. *Frontiers in Microbiology* 4,1-9 (www.frontiersin.org).
- Folimonov, A., Folimonova, S., Robertson, C., Garnsey, S., Hilf, M.E., Dawson, W. (2007). Cross-protection by *Citrus Tristeza Virus*: prevention of superinfection occurs only when plants are protected by isolates of the same strain. *International Positive Strand RNA Virus Symposium*.
- Fuchs Marc, Stephen Ferreira and Dennis Gonsalves (1997). Management of Virus Diseases by Classical and Engineered Protection. Department of Plant Pathology, Cornell University. p.19. <http://www.bspp.org.uk/mppol/1997/0116fuchs/#c>.
- Fulton R.W. (1986). Practices and precautions in the use of cross protection for plant-virus disease-control. *Annual Review of Phytopathology* 24, 67-81.
- Garnsey S.M., Gumpf D.J., Roistacher C.N., Civerolo E.L., Lee R.F., Yokomi R.K., and Bar-Joseph M. (1987). Toward a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus Tristeza Virus*. *Phytophylactica* 19, 151-157.
- Garnsey S.M., and Muller G.W. (1988). Efficiency of mechanical transmission of *Citrus Tristeza Virus*. *Proceedings, 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 46-54.
- Garnsey, S. M., and Lee, R. F. (1988). Tristeza. in: *Compendium of Citrus Diseases*. J. O. Whiteside, S. M. Garnsey, and L. W. Timmer, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 10. Gonsalves, D., Purcifull, D. E., and Garnsey, p. 48-50
- Garnsey S.M., Civerolo E.L., Gumpf D.J., Yokomi R.K., and Lee R.F. (1991). Development of a Worldwide Collection of *Citrus Tristeza Virus* Isolates. *Proceedings, 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp.113-120.
- Garnsey S.M. and Cambra M. (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. In: *Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis*. FAO. Rome p. 193-216.
- Garnsey S.M., Permar T.A., and Henderson C.T. (1993). Direct Tissue Blot Immunoassay (DTBIA) for Detection of *Citrus Tristeza Virus* (CTV). *Proceedings, 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 39-50.
- Garnsey S.M., Civerolo E., Lee R.F., Yokomi R.K. and Bene C.C. (1995). Using the Beltsville International CTV Collection facility to determine severity of Caribbean isolates of citrus

- tristeza virus. *Proceedings of the 3rd International Workshop "Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: management Strategies"* Lake Alfred, Florida. p. 253-259.
- Garnsey S.M., Gottwald T.R., and Yokomi R.K. (1998). Control Strategies for *Citrus Tristeza Virus*. In: *Plant Virus Disease Control*, (Hadidi A, Khetarpal RH, Koganezawa H, eds), APS Press, St. Paul, (USA). The American Phytopathological Society, p. 639-658.
- Garnsey S.M., Civerolo E., Gumpf D.J., Paul C., Hilf M.E., Lee R.F., Brlansky R.H., Yokomi R.K. and Hartung J.S. (2005). Biological characterization of an international collection of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) isolates. *Proceedings, 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 75-93.
- Gavriel I. (2002). The citrus certification program of Cyprus. In: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 420-422.
- George, F.E. (1993a). Micrografting. In: *Plant Propagation by Tissue Culture, Part I. The Technology*. 574 pages, Exegetics Ltd, England, pp. 64-66.
- George, F.E. (1993b). Methods of elimination. In: *Plant Propagation by Tissue Culture, Part I. The Technology*. 574 pages, Exegetics Ltd, England, pp.146-151.
- Georgiou, A. (2000 a). Performance of "Nova" mandarin on eleven rootstocks in Cyprus. *Scientia Horticulturae* 84, 115-126.
- Georgiou, A. (2000β). Citrus Biodiversity in Cyprus. *Proceedings of the Global Citrus Germplasm Network*, Orlando, Florida, USA. p. 43-48.
- Georgiou, A. (2002). Evaluation of rootstocks for "Clementine" mandarin in Cyprus. *Scientia Horticulturae*, 93, 29-38.
- Georgiou, A. (2004). Evaluation of rootstocks for "Valencia" orange. *Agricultura Mediterranea*. 134, 193-200.
- Georgiou, A. and Gregoriou C. (1999). Growth, yield, and fruit quality of "Shamouti" Orange on fourteen rootstocks in Cyprus. *Scientia Horticulturae*. 80, 113-121.
- Georgiou A. (2000). Citrus Biodiversity in Cyprus. *Proceedings of the Global Citrus Germplasm Network*, Orlando, Florida, USA. p. 43-48.
- Γεωργίου Α. (2010). Αξιολόγηση Υποκειμένων Εσπεριδοειδών. Ερευνητικό πρόγραμμα ΙΓΕ. Διάλεξη στο ΙΓΕ, Λευκωσία.
- Ghorbel R., Navarro L. and Duran-Vila N. (1998). Biological characterization of citrus tristeza virus isolates by in vitro tissue cultures. *Plant Pathology* 47, pp. 333-340.

- Gillings M., Broadbent P., Instro J., Lee R.F. (1993). Characterization of isolates and strains of Citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat proteine gene amplified by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 44: 305-317.
- Gottwald T.R., Garnsey S.M., Cambra M., Moreno P., Irely M. and Borbon J. (1998). Differential effects of *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii* on temporal increase and spatial patterns of spread of Citrus tristeza. *Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV*, pp. 120-129.
- Gottwald T.R., Garnsey S.M., Cambra M., Moreno P., Irely M., Borbon J., Sediles Jean A. and Rojas Solis A. (1995). Rate of disease increase and patterns of spread of CTV when vectored by *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii*. *Proceedings of the 3rd International Workshop "Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: management Strategies"* Lake Alfred, Florida. p. 44-49.
- Gottwald T.R., Polek M., and Riley K.M. (2002). History, Present Incidence, and Spatial Distribution of *Citrus tristeza virus* in the California Central Valley. *Proceedings, 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV*, pp. 83-94.
- Gottwald T.R. (2010). Concepts in the Epidemiology of *Citrus tristeza virus*. In: Karasev A.V. and Hilf M. *Citrus tristeza virus- Complex and Tristeza Diseases*. APS Press. USA (ISBN 978-0-89054-378-8) p. 133-149.
- Grant, T.J. 1967. Effect of heat treatments on tristeza and psorosis viruses in citrus. *Plant Disease Reporter*, 41: 232-234.
- Gregoriou, C. and Economides C.V. (1993). Tree Growth, Yield, and Quality of Ortanique Tangor on Eleven Rootstocks in Cyprus. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 118, 335-338.
- Gregoriou, C. and Economides C.V. (1994). Growth, Yield, and Fruit Quality of Nucellar Frost Valencia Orange on Fifteen Rootstocks in Cyprus. *Acta Horticulturae* 365, 57-68.
- Gregoriou S., Minas G., Kapari Th., Seraphides N., and Papayiannis L. (2007). Production of minitubers of the varieties Spunta, Nicola and Cara from healthy micro propagated material in Cyprus. *Potato production and innovative technologies*, pp.160-168.
- Greno V., Cambra M., Navarro L., and Duran-Vila N. (1990). Effect of antiviral chemicals on the development and virus content of citrus buds cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 45, 75-87.
- Guerri, J.; Moreno, P.; Lee, R.F. (1990) Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology* 80, 692-698.

- Hadidi A., R.K. Khetarpal, and H. Koganezawa. (1998). *Plant Virus Disease Control*. APS Press, The American Phytopathological Society, Minnesota, USA.
- Hadjinicolis A., Mawassi M., Gofman R., Ben-Shalom Y., Timar D. and Bar-Joseph M. (1995). Convenient detection of Citrus tristeza virus by the simple soaking of stem slices in wells of the ELISA plates (sELISA). Abstract in: *The Program and Abstracts of the XII Conference of the International Organization of Citrus Virologists*.
- Halbert S.E., and Brown L.G., 1996. *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), brown citrus aphid - identification, biology and management strategies. Fla. Dept. Agric. and Cons. Serv, Div. Plant Industry, Entomol. Cir. No. 374. 6 pp.
- Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hermoso de Mendoza A., Ballester-Olmos J.F., and Pina J.A. (1984). Transmission of Citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. *9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 23-27.
- Hoshmand A.R. (1998). “Analysis of Variance”. In” Hoshmand A.R. *Statistical Methods for Environmental & Agricultural Sciences*. CRC Press, N. York. 2nd Edition. (ISBN 0-8493-3152-8), pp. 185-216.
- Hughes G. and Gottwald T.R. (1998). Survey Methods for Assessment of *Citrus Tristeza Virus* Incidence. *Phytopathology* 88, p.715-723.
- Hung Th., Wu M.L., Su H.J. (2000). A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of *Citrus tristeza virus*. *J. Phytopathology* 148, 469-475.
- Ieki H., and Yamada S. (1981). Inactivation of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) with heat treatment: Heat tolerance and inactivation of CTV on Rootstock-scion combinations. *8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 20-24.
- Ieki H. (1997). Control of stem pitting disease caused by *Citrus Tristeza Virus* using protective mild strains in Navel orange. *Annual Phytopathological Society Jpn* 63, 170-175.
- Ilharco F.A., Sousa-Silva C.R. (2009). *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Homoptera, Aphidoidea), the tropical citrus aphid in continental Portugal. In: D'Onghia A.M. (ed.), Djelouah K. (ed.), Roistacher C.N. (ed.). “*Citrus tristeza virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry*” Bari: CIHEAM Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 65, p. 53- 58.
- Ioannou M., Kyriakou A. and Ioannou N. (1991). Production of healthy Lapithos Lemon plants by shoot-tip grafting *in vitro*. *Tech. Bulletin* 139. Agricultural Research Institute. Nicosia.

- Kapari-Isaia Th., Kyriakou A., Ioannou N., Gavriel J, Bar-Joseph M., Savva G., Polycarpou D., Loizias N., Iosephidou E., Hahjnicolis A., and Papayiannis C. (2000). A Six-Year Fight Against *Citrus Tristeza Virus* in Cyprus. *Proceedings 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 335-337.
- Kapari-Isaia Th., Minas G.J., Polykarpou D., Iosephidou E., Arseni Sp. 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 Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 417-419.
- Καπαρή-Ησαΐα Θ. και Κυριακού Α. (2003). Η εξάπλωση και αντιμετώπιση του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο. *Πρακτικά 20^{ου} Πανελληνίου Επιστημονικού Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών*. Σελ. 603-606.
- Καπαρή-Ησαΐα Θ., Κυριακού Α., Ιωάννου Ν., Γαβριήλ Ι. , Σάββας Γ. και Παπαγιάννης Λ., (2005). Ο ιός της τριστεζας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο, 1992-2004. Εκδόσεις Ι.Γ. Κασουλίδη & Υιός ΑΤΔ, Λευκωσία, ISBN 9963-1-6004-2, 46 σελίδες.
- Kapari-Isaia Th., Minas G., and Kyriakou A. (2004). Production of healthy Arakapas mandarin plants by shoot-tip grafting *in vitro*. Technical Bulletin 222, Agricultural Research Institute, Lefcosia, Cyprus. 7p.
- Kapari-Isaia Th., Kyriakou A., Polykarpou D., Panayiotou M., Papayiannis L., Škorić D. and Minas G. J. (2005). Micrografting *in vitro* for sanitation of the local “Polyphori” lemon in Cyprus. Abstract. *Proceedings. 7th International Congress of Citrus Nurserymen*. Cairo, Egypt, p.37-38.
- Καπαρή-Ησαΐα Θεοδώρα. (2006). Εξυγιάνση ποικυλίων και κλώνων εσπεριδοειδών στην Κύπρο. ISBN 9963-1-6005-0, Εκδόσεις ΚΩΝΟΣ, Λευκωσία, 204 σελίδες.
- Kapari-Isaia Th., Kyriakou A., Georgiou A., and Gregoriou C. (2006). “Effect of Citrus exocortis and related viroids on eleven citrus rootstocks” *Proceedings of the 13th Hellenic Phytopathological Congress*, p. 120.
- Kapari-Isaia Th., Kyriakou A., Papayiannis L., Tsaltas D., Gregoriou S. and Psaltis I. (2007). Rapid *in vitro* microindexing of viroids in citrus. *Plant Pathology* 57, 348–353.
- Kapari-Isaia Th., 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 Th., Protopapadakis E., Samouel St., Georgiou A., Doulis A. and Kyriakou A. (2011). Micropropagation *in vitro* of five new sour orange hybrid rootstocks. *Proceedings of the 25th Conference of the Hellenic Society for Horticultural Science*, 237-241.

- Kapari-Isaia, Th., Kyriakou A., Ioannou N., Gavriel G., Savva G, and Papayiannis L.C. (2011). A 20-year project for *Citrus tristeza virus* management in Cyprus. Proceedings of the 25th Conference of the Hellenic Society for Horticultural Science, p.153.
- Kapari-Isaia Th., Voloudakis A. E., Kyriakou A., Ioannides I., Papayiannis L., Samouel S., Koutsoumari E. M., Georgiou A., Minas G. (2011). Sanitation of citrus varieties and/or clones by *in vitro* micrografting in Cyprus and Greece. *Acta Horticulturae*, 892: 279-285.
- Καπαρή-Ησαία Θ., Παπαγιάννης Λ.Χ., Κυριακού Α., Βολουδάκης Α.Ε., Τσάλτας Δ., Ιωάννου Ν. (2014). Εξυγίανση του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών με μεθόδους θερμοθεραπείας, χημειοθεραπείας και μικροεμβολιασμού *in vitro*. Πρακτικά 17^{ου} Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, Βόλος, Σελ.138.
- Καπαρή-Ησαία Θ., Παπαγιάννης Λ.Χ., Κυριακού Α., Βολουδάκης Α.Ε., Τσάλτας Δ., Ιωάννου Ν. (2014). Βιολογική ανίχνευση του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών *in vitro*. Πρακτικά 17^{ου} Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, Βόλος, Σελ.136.
- Καπαρή-Ησαία Θ., Παπαγιάννης Λ.Χ., Κυριακού Α. (2014). Αξιολόγηση έξι υποκειμένων εσπεριδοειδών για ανεκτικότητα στον ιό της τριστέζας. Πρακτικά 17^{ου} Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, Βόλος, Σελ.137.
- Καπαρή-Ησαία Θ., Παπαγιάννης Λ.Χ., Κυριακού Α., και Ιωάννου Ν. (2014). Επισκοπήσεις και αντιμετώπιση του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο. Πρακτικά 17^{ου} Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, Βόλος, Σελ.135.
- Karasev, A. V., Boyko, V. P., Gowda, S., Nikolaeva, O. V., Hilf, M. E., Koonin, E. V., Niblett, C. L., Cline, K., Gumpf, D. J. & Lee, R. F. (1995). *Virology* 208 , 511-520.
- Κατής Ν., Χατζηλούκας Στ., Δόβας Χρ., Κοκκίνης Γ., και Χατζηβασιλείου Ε. (2001). Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA. Διαγνωστική Ιολογία. Τμήμα Γεωπονίας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.
- Koizumi M. (1983). Elimination of *Tatter leaf-citrange stunt virus* from Satsuma mandarin by shoot-tip grafting following pre-heat-treatment. *Proceedings, 9th International Organisation of Citrus Virologists Conference*. IOCV. 229-233.
- Kotzé J. M., Marais L. J. (1976). Cross protection – what is it? *Citrus Subtropical Fruit Journal*. 514 17–18.
- Κυριακοπούλου Η.Π. (1993). Εισαγωγή εις την Ιολογία Φυτών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, σελ. 46.
- Κυριακοπούλου Η.Π. (1999). Ο αναδύομενος ιός της τριστέζας των εσπεριδοειδών απειλεί την Ελλάδα. Εκδόσεις «ΖΕΥΣ Α.Ε.» Αθήνα. 15 σελίδες.

- Κυριακοπούλου Η.Π. και Δήμου Δ. (2008). Ιολογικές και παρόμοιες ασθένειες των εσπεριδοειδών. Γεωργία-Κτηνοτροφία σ. 104-121.
- Kyriakopoulou E.P. (1998). Virus and virus like diseases of citrus in Greece and certification. *Options Mediterraneennes*, Serie B/no 21. p 57-63.
- Kyriakou A., and Polycarpou D. (1989). Detection of citrus tristeza virus in Cyprus by indexing. FAO. Plant Protection Bulletin. p. 131-132.
- Kyriakou A., Polycarpou D., Efstathiou A., and Hadjinicoli A., (1993). *Citrus tristeza virus in Cyprus*. Proceedings, 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV. 69-72.
- Kyriakou A. (1992). Incidence in Cyprus of citrus exocortis viroid and its mechanical transmission. *Plant Pathology* 41, 20-24.
- Kyriakou, A., Eliades, G., Ioannou, N. and Kapari-Isaia Th. (1996). Effect of stubborn disease on growth, yield and fruit quality of Frost Washington Navek and Frost Valencia oranges in Cyprus. *Journal of Hort. Science* 71, 461-467.
- Kyriakou A., Ioannou N., Gavriel J., Bar-Joseph M., Papayiannis Chr., Kapari-Isaia Th., and Savva G. (1996). Management of *Citrus tristeza virus* in Cyprus. *Proceedings of the 13th International Organisation of Citrus Virologists Conference. IOCV*. 172-178.
- Kyriakou A. (1998) Virological problems and establishment of a certification programme of citrus in Cyprus. *Options Mediterraneennes*, Serie B/no 21. p 51-55.
- Kyriakou A., Kapari-Isaia Th., and Ioannou N. (2002). The Virus Disease Situation of Citrus in Cyprus-A Brief Review. *Proceedings, 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, pp. 427-431.
- Kyriakou A, Kapari-Isaia T, Ioannou N (2002). A 10-year programme for the control of citrus tristeza virus (CTV) in Cyprus. Review for 2000-2001, Agricultural Research Institute, Nicosia, Special Edition 40th Anniversary pp 86-89.
- Kyriakou A., Ioannou M., Hadjinicolis A., Hoffman R., Antoniou E., Papayiannis L., Kapari-Isaia Th., and Ioannou N. (2005). Effect of Citrus Exocortis and Cachexia Viroids on Growth, Yield and Fruit Quality of “Lapithou” lemon on Sour Orange Rootstock. In Proc. 16th IOCV, Riverside, California, 257-263.
- Kyriakou A., Kapari-Isaia Th., Papayiannis L.C., Savvas G., Ioannou N. (2006). A thirteen year survey for *Citrus tristeza virus* (CTV) in Cyprus. Proceedings of the 12th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union 11-15 June 2006, Rhodes Island, Greece pp
- Kyriakou A., Kapari-Isaia Th., Gavriel I, Papayiannis L., and Ioannou N. (2009). *Citrus tristeza virus* (CTV) in Cyprus, 1992-2004. *Options Mediterraneennes*, Serie B/no 65. p. 79-84.

- Lee R.F., Calvert L.A., Nagel J. and Hubbard J.M. (1984). Syringe injection of water into the trunk: a rapid diagnostic test for citrus blight. *Plant Disease* 68, 511-513.
- Lee R.F. and Brlansky, R.H (1990). Evaluation of the use of mild strains of citrus tristeza to maintain mature citrus on sour orange rootstock. *Proceedings Florida State Horticultural Society* 103, 83.
- Lee R.F. and Rocha-Peña M.A. (1992). Citrus tristeza virus. In: *Plant Diseases of International Importance*, Vol.III, eds. Mukhopadhyay A.N., Chaube H.S., Kumar J. and Singh U.S.(New Jersey: Prentice Hall), 226-249.
- Lee R.F., Baker P.S., and Rocha-Peña M.A. (1994). *The Citrus Tristeza Virus (CTV)*. International Institute of Biological Control, U.K. 197p.
- Lee R.F., Derrick K.S., Niblett C.L., and Pappu H.R. (1995). When to use mild strain cross protection (MSCP) and problems encountered. *Proceedings of the 3rd International Workshop "Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: management Strategies"* Lake Alfred, Florida. p. 158-161.
- Lee F. R. (2000). Why Have Mandatory Citrus Certification Programs? *Proceedings, 14th International Organisation of Citrus Virologists Conference, IOCV*. 311-325.
- Lee F.R. (2006). Cachexia, Ecoport Picture Databank. <http://ecoport.org>.
- Lee R.F. and Keremane M. (2013). Mild strain cross protection of tristeza: a review of research to protect against decline on sour orange in Florida. *Frontiers in Microbiology* 4. (259) 1-11 (www.frontiersin.org).
- Lizarraga R.E., Salazar L.F., Roca W.H and Schilde-Rentscheler. (1980). Elimination of *potato spindle tuber viroid* by low temperature and meristem culture. *Phytopathology* 70:754-755.
- Lloyd G., and McCown B., (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proceedings*, 30, p. 421.
- Luken H., Krone F., Adamides C. and Grivas G. (1987). Calcareous soils of Cyprus. Technical Cooperation. Project No.81.2224.4, Ministry of Agriculture and Natural Resources, Nicosia, 256p.
- Luttig M., van Vuuren S. P, van der Vyver J. B. (2002). "Differentiation of single aphid cultured sub-isolates of two South African *Citrus tristeza virus* isolates from grapefruit by single-stranded conformation polymorphism," in *Proceedings of the fifteenth Conference of International Organization of Citrus Virologists* eds Duran-Vila N., Milne R. G, da Graça J. V., editors. (Riverside, CA: IOCV;) pp 186–196.

- Marais L. J. and Breytenbach J. H. J. (1996). The effect of tristeza stem pitting on the Star Ruby grapefruit industry in South Africa. *Proceedings International Society Citriculture*, 1: 357–365.
- Marais L.J. and Kotze J.M. (1984). Techniques for the selection of mild isolates of *Citrus tristeza virus*. *Proceedings, 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV. 53-56.
- Marais L.J., Marais M.L. and Rea M. (1993). Effect of *Citrus tristeza* stem pitting on fruit size and yield of march grapefruit in southern Africa. *Proceedings, 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV. 163-167.
- Moreno P., Guerri J., Ballester-Olmos J.F., Albiach R., and Martinez M.E. (1993). Separation and interference of strains from a *Citrus tristeza virus* isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* 42, 35-41.
- Moreno P., Ambros S., Albiach-Marti M. R., Guerri J., Pena L. (2008). *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* 9, 251–268.
- Mathews D.M. (1997). Comparison of Detection Methods for *Citrus Tristeza Virus* in Field Trees during Months of Nonoptimal Titer. *Plant Disease*: 81 (5) p. 525-529.
- Michaud, J. P. and Alvarez, R. R. 2000. First collection of brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae) in Quintana Roo, México. *Florida Entomologist*. 83:357-358.
- Minas G., Papayiannis L., Kapari-Isaia Th. (2007a). A rapid protocol for in vitro micro propagation of grapevine, cultivars and root stocks, starting from apical meristem. *Acta Horticulturae*, 741, p 283-288.
- Minas G., Gregoriou S., Kapari-Isaia Th. and Papayiannis L. (2007b). Seed potatoes production in Cyprus starting from *in vitro* apical meristem. *Acta Horticulturae*, 741, 283-288.
- Moreno P., Guerri J., and Munoz. (1990). Identification of Spanish strains of *Citrus tristeza virus* by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology* 80 (5) 477-482.
- Moreno P., Guerri J., Ballester-Olmos J.F., Albiach R. and Martinez M.E. (1993). Separation and interference of strains from a *Citrus tristeza virus* isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* 42, 35-41.
- Mooney P., Dawson T. and Harty A. (2007). *Citrus Tristeza Virus* Preimmunization Strategies, *HortResearch* Publication, 5p. <http://www.hortnet.co.nz/publications/science/kk0894.htm>

- Muhammad I., Muhammad A., Attique A., and Sher H. (2005). Elimination of *Citrus tristeza closterovirus* from bud-wood through thermotherapy. *Pakistan Journal of Botany* 37(2), 423-430.
- Mukhopadhyay, S., R. Jaishree, B.S. Sharma, A. Gurung, R.K. Sengupta and P.S Nath. (1997). Micropropagation of Darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting. *Journal of Horticultural. Science.* 72 (3) p.493-499.
- Müller G. W., Costa A. S. (1987). Search for outstanding plants in tristeza-infected citrus orchards: the best approach to control the disease by pre-immunization. *Phytophylactica* 19 197–198.
- Müller G. W, Rezende J. A. M. (2004). “Preimmunization: applications and perspectives in virus disease control,” in *Diseases of Fruits and Vegetables* Vol. I ed. Naqvi S. A. M. H., editor. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers;) 361–395.
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Nakahara, K., T. Hataya, I. Uyeda. (1999). A simple, rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detectind viroids by hybridization and RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 77: 47-58.
- Navarro, L., C.N. Roistacher, and T. Murashige. (1975). Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus free citrus. *Journal of the American. Society of Horticultural Science*, 100 (5): 471-479.
- Navarro, L., C.N. Roistacher, and T. Murashige. (1976). Effect of Size of Shoot Tips on Psorosis-A and Exocortis Content of Navel Orange Plants Obtained by Shoot-Tip Grafting *In vitro*. *Proceedings, 7th International Organisation of Citrus Virologists Conference*, Riverside, California p. 194-197.
- Navarro, L. (1993). Citrus sanitation, quarantine and certification programs. *Proceedings, 12th International Organisation of Citrus Virologists Conference*, Riverside, California. p. 383-391.
- Navarro L., Llacer C., Cambra M., Arregui J., Juarez J. (1982). Shoot-tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* Batsch). *Acta Horticulturae* 130, 185-192.
- Navarro, L. (1988). Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species. *Acta Horticulturae* 227:43-56.

- Navarro, L., E.L. Civerolo, J. Juarez, S.M. Garney. (1991). Improving Therapy Methods for Citrus Germplasm Exchange. *Proceedings, 11th International Organisation of Citrus Virologists Conference*, Riverside, California. p. 400-408.
- Navarro, L., J., Juarez, and J.A., Pina. (2001). Strategies and problems for the production of high quality nursery citrus trees worldwide. *Proceedings of the 16th World Congress of the International Society of Citrus Nurserymen*, Brazil. p. 1-10.
- Nelson S., Melzer M. and Hu J. (2011) Citrus tristeza virus in Hawaii. *Plant Disease* 1-16.
- Niblett CL, Gench H, Cevik B, Halbert S, Brown L, Nolasco G, Manjunath VJ, Febres HR, Pappu HR, Lee RF (2000). Progress on strain differentiation and the epidemiology of citrus tristeza virus. *Virus research* 71: 97-106.
- Nolasco G, Squeira Z, Soares C, Mansinho A, Bailey A, Niblett CL (2002). Asymmetric PCR ELISA: Increased sensitivity and reduced costs for the detection of plant viral and other nucleic acids. *European Journal of Plant Pathology* 108: 293-298.
- Nolasco G., Fonseca F., Silva G., (2007). Occurrence of genetic bottlenecks during Citrus tristeza virus acquisition by *Toxoptera citricidus* in field conditions. *Archives of Virology*. Published online. DOI DOI 10.1007/s00705-007-1089-8.
- Nolasco G., Santo C., Silva G., Fonseca F. (2009). Development of an asymmetric PCR-ELISA typing assay for citrus tristeza virus based on the coat protein gene. *Journal of Virological Methods* 155, 97–108.
- Ochoa F., Carballo O., Trujillo G., Izaquirre M. and Lee R. (1993). Biological Characterization and evaluation of cross protection potential of citrus tristeza virus isolates in Venezuela. *Proceedings, 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, IOCV. p.1-7.
- Ochoa F., Beretta M.J.G., Derrick K.S., Lee R.F., and Rangel E. (1993). Comparison of citrus sudden decline from Venezuela with citrus blight from Florida and decline from Brazil. *Proceedings, 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, IOCV. p.116-120.
- Ohta, S., Kuniga, T., Nishikawa, F., Yamasaki, A., Endo, T., Iwanami, T. and Yoshioka, T. (2011). Evaluation of novel antiviral agents in the elimination of satsuma dwarf virus (SDV) by semi-micrografting in citrus. *J Japan Soc Hor Sci* 80, 145-149.
- Παναγόπουλος Χ.Γ. (1993). Ασθένειες των εσπεριδοειδών. «Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου» Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα. Σελ. 241-322.
- Papayiannis L., D., Polycarpou, G., Savva, E., Iosephidou, A., Kyriakou and N., Katis, (2002). The Effect of Temperature on the Detection of *Citrus tristeza virus* by DAS-ELISA.

- Proceedings, 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. p. 438-439.
- Papayiannis L.C., Santos C., Kyriakou A., Kapari T., and Nolasco G., (2007). Molecular characterization of Citrus tristeza virus isolates from Cyprus on the basis of the coat protein gene. *Journal of Plant Pathology* 89(2), 281-285
- Παπαγιάννης Λ.Χ., Καπαρή-Ησαΐα Θ., (2014). Χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστέτσας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο με τη χρήση μοριακών τεχνικών στην Κύπρο. Πρακτικά 17^{ου} Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, Βόλος, Σελ.139.
- Papasolomontos, A. and C. V., Economides (1968). The presence of tristeza virus in certain species of citrus in Cyprus. *FAO Plant Protection Bulletin* 16 (1): p. 8-9.
- Pappu HR, Karasev AV, Anderson EJ, Pappu SS, Hilf ME, Febres VJ, Eckolff RMG, McCaffery M, Boyoko V, Gowda S, Dolja VV, Koonin EV, Guampf DJ, Cline KC, Garnsey SM, Dawson RF, Niblett CL (1994). Nucleotide sequence organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199: 35-46.
- Paduch-Cichal E. and Kryczyński S. (1987). A Low Temperature Therapy and Meristem-Tip Culture for Eliminating four Viroids from Infected Plants. *Journal of Phytopathology*. 118 (4) 341–346. Permar T.A. and Garnsey S.M. (1991). Comparison of biological indexing and immunological assays for identifying severe Florida isolates of Citrus tristeza virus. *Proceedings, 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. pp. 56-59.
- Permar T.A., Garnsey S.M., Gumpf D.J., and Lee R.F. (1990). A monoclonal antibody that discriminates strains of Citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80, 224-228.
- Pina, A. J., L. Navarro. 2001. Certification Program for Citrus Nursery plants in Spain. *Proceedings, 6th World Congress of the International Society of Citrus Nurserymen*. Brazil. p. 26-31.
- Polek, M., G. Vidalakis and K. Godfrey. 2007. Citrus bacterial canker disease and Huanglongbing (citrus greening), University of California, Agricultural and Natural Resources, Publication 8218, ISBN-13: 978-1-60107-439-3, ISBN-10: 1-60107-439-5.
- Postman, J.D. and Hadidi, A. (1995). Elimination of Apple scar skin viroid from pears by *in vitro* thermotherapy and apical meristem culture. *Acta Hort. (ISHS)* 386:536-543.
- Powell C.A., Pelosi R.R., and Bullock R.C. (1997). Natural field spread of mild and severe isolates of Citrus tristeza virus in Florida. *Plant Disease* 81(1) 18-20.

- Pratt, R. M. and Jorgensen P. S. (1972). Prebudded mex can lime cuttings for rapid index for tristeza, *Proceedings 5th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Univ. Fla.*, Gainesville, pp. 157-158.
- Ramos, C. Roistacher, C. Muller, G. Bederski, K. Rangel, Benjamin, Lee R. 2007. Molecular Characterization of Citrus Tristeza Virus Isolates from Mild Strain Cross Protection Experiments in Peru.
http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=201436.
- Rocha- Peña M.A., and Lee R.F. (1991). Serological techniques for the detection of Citrus tristeza virus. *Journal of Virological Methods* 34, 311-331.
- Rocha- Peña M.A., Niblett C.N., Lee R.F., Lastra R., Ochoa-Corona F.M., Garnsey S.M. and Yokomi R.K. (1995). *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* 79,437-444.
- Rocha-Peña M.A., Ochoa-Corona F.M., Martinez-Soriano J.P., Roistacher C.N. and Lee R.F. (1998). *Citrus tristeza virus*: Events that occur before, during and after disease epidemics. *Subtropical Plant Science*, 50:26-36.
- Roistacher C.N., Bar-Joseph M., and Carson T. (1984). Preferential feeding by *Aphis gossypii* on young leaves of sweet orange, grapefruit and lemon. *Proceedings, 9th International Organisation of Citrus Virologists Conference, IOCV*, pp. 19-22.
- Roistacher C.N. and Gumpf D.C. (1986). A historical perspective on seedling yellow virus. *Citrograph* 71:189-192.
- Roistacher, C. N., J .A. Dodds, and J. A. Bash (1988). Cross protection against citrus tristeza seedling yellows (CTV-SY) and stem pitting (CTV-SP) viruses by protective isolates developed in greenhouse plants. *Proceedings, 10th International Organisation of Citrus Virologists Conference, IOCV*, pp.91-100.
- Roistacher C.N., and Moreno P. (1991). The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus – A review. *Proceedings, 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV* pp. 7-19.
- Roistacher C.N. (1991). Techniques for biological detection of specific citrus graft-transmissible diseases. In: *Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis.* FAO. Rome. p. 11-34.
- Roistacher C.N. and Dodds J.A. (1993). Failure of 100 mild *Citrus tristeza virus* isolates from California to cross protect against a challenge by severe sweet orange stem pitting isolates. *Proceedings, 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV.* 100-106.

- Roistacher C.N. (1995). Tristeza. In: A Historical Review of the Major Graft –Transmissible Diseases of Citrus. FAO. Cairo, Egypt. p.65-78.
- Roistacher C.N., Canton H. and Reddy P.S. (1995). Severe decline of citrus on exocortis-susceptible rootstocks in Belize and the costs incurred by the use of infected budwood. Proceedings of the 3rd International Workshop “Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: management Strategies” Lake Alfred, Florida. p. 130-138.
- Roistacher C.N., da Graca J.V. and Muller G.W. (2010). Cross protection against Citrus tristeza virus - a review. Proceedings, 17th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. p. 1-27.
- Roman M.P., Cambra M., Juarez J., Moreno P. and Duran-Vila (2004). Sudden death of citrus in Brazil: A graft-transmissible bud union disease. *Plant Disease* 88(5):453-467.
- Roossinck M.J. (1997). Mechanisms of plant virus evolution, *Annual Review of Phytopathology* Vol. 35: 191-209.
- Roy A., Ramachandran P., Brlanskey R.H., (2003). Grouping and comparison of Indian *Citrus tristeza virus* isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. *Arc. Virology* 148: 707-722.
- Roy A., and Brlanskey R.H. (2009) Populations dynamics of a Florida *Citrus tristeza virus* isolate and aphid-transmitted subisolates: identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission. *Phytopathology* 99(11) 1297-1306.
- Rubio L., Guerri J., Moreno P.(2013). Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*. *Frontiers in Microbiology/Virology*, 44 (151), 1-15. www.frontiersin.org.
- Sagheer A., Zhou C., Zhou Y., Cao M., and Wang X. (2012). Distribution and research advances of Citrus tristeza virus. *Journal of Integrative Agriculture* 11(3):346-358.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487–491.
- Sambade A., Rubio L., Garnsey S.M., Costa N., Muller G.W., Peyrou M., Guerri J., and Moreno P. (2002). Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of Citrus tristeza virus: application to monitoring cross-protection. *Plant Pathology* 21, 257-265.

- Sambade A., Ambros S., Lopez C., Ruiz-Ruiz S., Hermoso A., Flores R., Guerri J., and Moreno P. (2007). Preferential accumulation of severe variants of Citrus tristeza virus in plants co-inoculated with mild and severe variants. *Archives of Virology* 152 (6).
- Sanjeev S., Balwinder S., Gita R., Aijaz Asghar Z., Vipin H., Aninash N., Gurdeep Singh V., (2007). Production of Indian Ringspot Virus Free plants from Kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. *Journal of Central European Agriculture*, Vol. 8, No1: 1-7.
- Saponari, M., Manjunath K. and Yokomi R., (2008). "Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan)." *J Virol Methods* 147(1): 43-53.
- Sarbagh, S., H. Waterworth and D.Thompson. (2001). Role of Plant Tissue Cultures in International Exchange and Quarantine of Germplasm in the United States and Canada. *Hortscience*, Vol. 36 (6). p. 1015-1021.
- Semancik SJ, (1988). Citrus Exocortis Disease-1976 to 1986. In *Proceedings, 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, California, 136-151.
- Sieburth J.P., and Nolan G.K. (2005). Survey of stem pitting *Citrus tristeza virus* in commercial citrus groves in Florida. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 118:40-42.
- Singh, I.P. (2001). Shoot-tip grafting of Mosambi (*C. sinensis* L. Osbeck) in India. *Proceedings, 16th World Congress of the International Society of Citrus Nurserymen*, Brazil. p. 128-130.
- Steel, R. and Torrie, J. (1960) "Analysis of Variance I: The one way classification and Analysis of Variance II: Multiway classifications". In: Steel, R. and Torrie, J. *Principles and Procedures of Statistics with special reference to the Biological Sciences*. Mc Graw-Hill Book Company, London. 59-13216, pp. 99-160.
- Varveri Chr., Maliogka V. and Kapari Th. (2015). Principles for Supplying Virus-Tested Material in *Advances in Virus Research* 91(1):1-32.
- Van Vuuren S. P., Collins R. P., and Da Graça J. V. (1991). The performance of exotic Citrus tristeza virus isolates as preimmunizing agents for sweet orange on sour orange rootstock under natural disease pressure in South Africa. *Proceedings, 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. p. 60-63.
- Van Vuuren S. P., Collins R. P., and Da Graça J. V. (1993). Evaluation of Citrus Tristeza Virus Isolates for Cross Protection of Grapefruit in South Africa. *Plant Disease* 77(1) 24- 28.

- Vidalakis G., da Graça J., Dixon W.N. , Ferrin D., Kesinger M., Krueger R.R., Lee F. R., Melzer M.J. , Olive J., Polek M.L., Sieburth J.P., Williams L.L., and Wright C.G., (2010). Citrus Quarantine Sanitary and Certification Programs in the US. *Citrograph* 26.
- Volk, G.M., Bonnard R., Krueger R., Lee R. (2012). Cryopreservation of citrus shoot tips using micrografting and recovery. *Cryoletters*. Vol. 33 (6), 418-426.
- Yokomi R.K., Garnsey S.M., Civerolo E.L. and Gumpf D.J. (1989). Transmission of exotic *Citrus tristeza* isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*. *Plant Disease* 73, 552-556.
- Yokomi K.R. (1995). Why the concern about spread of brown citrus aphids into new citrus areas. Proceedings of the 3rd International Workshop “Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: management Strategies” Lake Alfred, Florida. p. 27-31.
- Yokomi K.R. and DeBorde R.L. (2005) Incidence, Transmissibility and Genotype Analysis of Citrus tristeza virus (CTV) isolates from CTV eradicated and noneradicated districts in Central California. *Plant Disease* 89, 859-866.
- Yokomi R.K., Polek M., and Gumpf D.J. (2010). Transmission and spread of Citrus tristeza virus in Central California. In: Karasev A.V. and Hilf M. *Citrus tristeza virus- Complex and Tristeza Diseases*. APS Press. USA (ISBN 978-0-89054-378-8) p. 151-166.
- Weiland C.M., Cantos M., Troncoso A., and Perez-Camacho (2004). Regeneration of Virus-Free Plants by in vitro chemotherapy of GFLV (grapevine Fanleaf Virus) infected explants of *Vitis vinifera* cv “Zalema” *Acta Horticulturae* 652, 463-466.
- Wallace J.M. (1978). Virus and viruslike diseases. In: The Citrus Industry Vol.4. W. Reuther, E.C. Calavan and G.E. Carman, (eds). *Div. Of Agric. Science* Univ. Of California, Berkeley. p. 67-84.
- Walkey D. (1991). Applied Plant Virology. Chapman and Hall, p.257-259.
- Whiteside J.O., Garnsey S.M., and Timmer L.W. (1989). Compendium of Citrus Diseases, APS Press, *The American Phytopathological Society*, 80p.
- Zanutto C.A., Corazza M.J., de Carvalho Nunes W.M., Muller G.W. (2013). Evaluation of the protective capacity of new mild Citrus tristeza virus (CTV) isolates selected for a preimmunization program. *Scientia Agricola* 70(2)116-124.
- Zemzami M, Garnsey SM, Nadori EB, Hill JH (1999) Biological and serological characterization of citrus tristeza virus (CTV) isolates from Morocco. *Phytopathol. Mediterr.* 38: 95-100.
- Zhang X.S. and Holt J. (2001). Mathematical Models of Cross Protection in the Epidemiology of Plant-Virus Diseases. *Phytopathology* 91(10) p. 924-934.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. Σύντομα πρωτόκολα των μεθόδων που αναπτύχθηκαν

1.1. Βιολογική ανίχνευση του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών *in vitro*

1.1.1. Παρασκευή θρεπτικών υποστρώματων για ιστοκαλλιέργεια

Τα θρεπτικά υποστρώματα παρασκευάζονται ως ακολούθως:

1. Ζυγίζονται οι ποσότητες των υλικών που χρειάζονται για το υπόστρωμα όπως sucrose, phytagel, MS salts ή άλλο σε ζυγαριά ακριβείας.
2. Θερμαίνεται 1 lt απεσταγμένο νερό.
3. Σε ένα δοχείο pyrex αναμιγνύονται όλα τα υλικά (εκτός απ' αυτά που μπορεί να καταστραφούν σε ψηλές θερμοκρασίες).
4. Το δοχείο τοποθετείται σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα όπου θερμαίνεται στους 80 °C καθώς αναδεύονται τα υλικά. Αφού αναμειχθούν καλά τα υλικά γίνονται ένα παχύρρευστο ομοιογενές μείγμα.
5. Μέτρηση pH και ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 5.7 με NaOH ή HCl.
6. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες 25x150mm pyrex και σε κάθε σωλήνα τοποθετείται 20-25 ml του θρεπτικού υποστρώματος. Οι σωλήνες σφραγίζονται με ειδικό πώμα.
7. Ακολούθως οι σωλήνες αποστειρώνονται σε κλίβανο αποστείρωσης ή σε ειδική χύτρα ταχύτητας για 20 min, μετά το σημείο βρασμού.
8. Αφού κρυώσουν οι σωλήνες τοποθετούνται στο ψυγείο στους 4-8°C.

1.1.2. Μικροεμβολιασμός μοσχευμάτων και Φύτευση στους σωλήνες

Συλλέγονται κλαδίσκοι μεξικανικής λιμεττίας από υγιή δενδρύλλια και άλλοι από προσβεβλημένα, από το δικτυοκήπιο ή το θερμοκήπιο και μεταφέρονται στο εργαστήριο όπου γίνεται η κατάλληλη επεξεργασία ώστε να μπορούν να εμβολιαστούν και να φυτευτούν.

Αρχικά αποστειρώνεται ο θάλαμος ασηπτικών συνθηκών για 30 min με υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Κατά την διάρκεια της αποστείρωσης του θαλάμου προετοιμάζονται τα δείγματα των εσπεριδοειδών ως ακολούθως:

1. Τοποθετούνται οι βλαστοί των εσπεριδοειδών στον πάγκο στο εργαστήριο.
2. Αφαιρούνται τα φύλλα και τα αγκάθια.
3. Κόβονται οι βλαστοί με ένα ή δύο οφθαλμούς τουλάχιστον και μήκος 1-1,5cm.
4. Αποστειρώνονται με ανάδευση για 10 λεπτά, ανά 10 κομμάτια σε διάλυμα που περιέχει 25% χλωρίνη και 2-3 σταγόνες Tween. Σε κάθε δοχείο τοποθετείται αυτοκόλλητο με την κατάλληλη σήμανση.
5. Ξεπλένονται 3 φορές με απεσταγμένο νερό στον ασηπτικό θάλαμο.
6. Αποστειρώνεται οι λαβίδες και τα μαχαιρίδια με εμβάπτιση σε αλκοόλη και ακολούθως κάψιμο σε φλόγα.
7. Τοποθετείται ένα κομμάτι αποστειρωμένο χαρτί (filter paper) στη βάση του στερεοσκοπίου όπου τοποθετούνται τα μικρομοσχεύματα που θα εμβολιαστούν. Για κάθε μόσχευμα που εμβολιάζεατι χρησιμοποιείται άλλο χαρτί.
8. Με την βοήθεια της λαβίδας και του μαχαιριδίου γίνεται ο μικροεμβολιασμός που είναι στην ουσία τεχνητή μόλυνση του μοσχεύματος λιμεττίας με εμβολιασμό φλοιού (τυφλοί εμβολιασμοί) από δενδρύλιο μολυσμένο με τον ιό της τριστεζας. Στο μόσχευμα γίνεται τομή σχήματος «H» και εκεί τοποθετείται το εμβόλιο (Εικόνες 2.5, 4.1).
9. Αποστειρώνεται ο δοκιμαστικός σωλήνα και το πώμα αφού ανοίξουν πριν την φύτευση του εμβολιασμένου μοσχεύματος σε φλόγα.
10. Φυτεύεται ένα μόσχευμα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
11. Ακολουθεί σήμανση για κάθε σωλήνα με επικόλληση ετικέτας στην οποία καταγράφεται το είδος του μοσχεύματος (ML), του μολύσματος, η ημερομηνία φύτευσης και το είδος του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε.
12. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε θάλαμο σταθεράς θερμοκρασίας 22-24^ο C, με εναλλαγή φωτός (16 ώρες) και σκοταδιού (8 ώρες) κάτω από ειδικές λάμπες φωτοσύνθεσης .
13. Αμέσως μετά την έκπτυξη των φύλλων από τα μοσχεύματα λιμεττίας *in vitro* άρχισε η καταγραφή παρατηρήσεων ως προς την εκδήλωση συμπτωμάτων στα μικρόφυτα.
14. Τα μοσχεύματα εσπεριδοειδών που δεν χρησιμοποιήθηκαν και θα χρησιμοποιηθούν τις επόμενες μέρες, τυλίγονται αεροστεγώς αφού πρώτα τυλίξουμε τις άκρες τους με βρεγμένο χαρτί φυλάγονται στο ψυγείο.

1.2. Βιολογικός διαχωρισμός σοβαρών και ήπιων φυλών του ιού της τριστεζας των εσπεριδοειδών *in vitro*

1.2.1. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων για ιστοκαλλιέργεια (όπως περιγράφεται πιο πάνω 8.1.1)

1.2.2. Μικροεμβολιασμός μικρομοσχευμάτων Μεξικανικής λιμεττίας με το προς εξέταση υλικό και Φύτευση στους σωλήνες (όπως περιγράφεται πιο πάνω 8.2.1) ή

1.2.3. Φύτευση μολυσμένων μικρομοσχευμάτων Μεξικανικής λιμεττίας από δενδρύλλια προσβεβλημένα με τριστεζα που έχουν αναπτυχθεί στο θερμοκήπιο.

1. Κόβονται οι βλαστοί ML με ένα ή δύο οφθαλμούς τουλάχιστον και μήκος 1-1,5cm.
2. Αποστειρώνονται με ανάδευση για 10 λεπτά, ανά 10 κομμάτια σε διάλυμα που περιέχει 25% χλωρίνη και 2-3 σταγόνες Tween. Σε κάθε δοχείο τοποθετείται αυτοκόλλητο με την κατάλληλη σήμανση.
3. Ξεπλένονται 3 φορές με απεσταγμένο νερό στον ασηπτικό θάλαμο.
4. Αποστειρώνεται οι λαβίδες με εμβάπτιση σε αλκοόλη και ακολούθως κάψιμο σε φλόγα.
5. Με την βοήθεια της λαβίδας φυτεύεται ένα μόσχευμα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
6. Ακολουθεί σήμανση για κάθε σωλήνα με επικόλληση ετικέτας στην οποία καταγράφεται το είδος του μοσχεύματος, του μολύσματος, η ημερομηνία φύτευσης και το είδος του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε.
7. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε θάλαμο σταθεράς θερμοκρασίας 22-24° C, με εναλλαγή φωτός (16 ώρες) και σκοταδιού (8 ώρες) κάτω από ειδικές λάμπες φωτοσύνθεσης.
8. Φύτευση υγιών μικρομοσχευμάτων Μεξικανικής λιμεττίας με τον ίδιο τρόπο (μάρτυρες).

1.2.4. Καταγραφή συμπτωμάτων

1.3. Εξυγίανση ιοειδών εσπεριδοειδών με θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών *in vitro* και μικροεμβολιασμό

1.3.1. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων για ιστοκαλλιέργεια των μοσχευμάτων που θα υποστούν θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών (όπως περιγράφεται πιο πάνω 8.1.1).

1.3.2. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων για φύτευση σπερμάτων εσπεριδοειδών *in vitro* (όπως περιγράφεται πιο πάνω 8.1.1). Τα σπέρματα αυτά θα δώσουν τα σπορόφυτα που θα χρησιμοποιηθούν σαν υποκείμενα κατά τον μικροεμβολιασμό.

1.3.3. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων για φύτευση των μικροεμβολιασμένων μικροφυτών

1. Το θρεπτικό υπόστρωμα είναι υγρό και περιέχει άλατα MS, inositol, thiamine HCl, pyridoxine HCl, nicotinic acid, σακχαρόζη, και νερό (1 lt). (pH 5.7). (Πίνακας 2.4).

2. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες 25x150mm pyrex και σε κάθε σωλήνα τοποθετείται 20-25 ml του θρεπτικού υποστρώματος.

3. Κατασκευάζονται ειδικές γέφυρες από διηθητικό χαρτί διαμέτρου 9 cm και τοποθετούνται μέσα στους σωλήνες με το υπόστρωμα. Οι σωλήνες σφραγίζονται με ειδικό πάμα.

4. Ακολούθως οι σωλήνες αποστειρώνονται σε κλίβανο αποστείρωσης ή σε ειδική χύτρα ταχύτητας για 20 min, μετά το σημείο βρασμού.

5. Αφού κρυώσουν οι σωλήνες τοποθετούνται στο ψυγείο στους 4-8°C.

1.3.4 Φύτευση μοσχευμάτων προσβεβλημένων με ιοειδή

1. Κόβονται οι βλαστοί με ένα ή δύο οφθαλμούς τουλάχιστον και μήκος 1-1,5cm.

2. Αποστειρώνονται με ανάδευση για 10 λεπτά, ανά 10 κομμάτια σε διάλυμα που περιέχει 25% χλωρίνη και 2-3 σταγόνες Tween. Σε κάθε δοχείο τοποθετείται αυτοκόλλητο με την κατάλληλη σήμανση.

3. Ξεπλένονται 3 φορές με απεσταγμένο νερό στον ασηπτικό θάλαμο.

4. Αποστειρώνεται οι λαβίδες με εμβάπτιση σε αλκοόλη και ακολούθως κάψιμο σε φλόγα.

5. Με την βοήθεια της λαβίδας φυτεύεται ένα μόσχευμα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
6. Ακολουθεί σήμανση για κάθε σωλήνα με επικόλληση ετικέτας στην οποία καταγράφεται το είδος του μοσχεύματος, του μολύσματος, η ημερομηνία φύτευσης και το είδος του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε.
7. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε θάλαμο σταθεράς θερμοκρασίας 22-24° C, με εναλλαγές φωτός (16 ώρες) και σκοταδιού (8 ώρες) κάτω από ειδικές λάμπες φωτοσύνθεσης .
8. Αμέσως μετά την έκπτυξη των φύλλων από τα μοσχεύματα *in vitro*, σε 20-30 μέρες περίπου, οι σωλήνες μεταφέρονται για την θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών σε θάλαμο σταθεράς θερμοκρασίας 4 °C, με εναλλαγή φωτός (16 ώρες) και σκοταδιού (8 ώρες) για 30 μέρες.

1.3.5. Φύτευση σποροφύτων-υποκειμένων *in vitro*

1. Εξαγωγή σπέρματων από τον καρπό
2. Αφαίρεση των δύο προστατευτικών καλύματων του περισπεμίου
3. Αποστείρωση των επεξεργασμένων σπέρματων σε διάλυμα χλωρίνης (30%) + Tween 20 (1%)
4. Ξεπλένονται με αποστειρωμένο νερό 3-4 φορές υπό ασηπτικές συνθήκες
5. Φύτευση με βοήθεια λαβίδας υπό ασηπτικές συνθήκες σε 20-25 ml θρεπτικό υπόστρωμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες 25x150mm.
6. Σε κάθε σωλήνα φυτεύονται 2-3 σπέρματα.
7. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε θάλαμο σταθεράς θερμοκρασίας 25-27°C, στο σκοτάδι για 15-25 μέρες.

1.3.6. Μικροεμβολιασμός *in vitro*

1. Τα μικρόφυτα στους σωλήνες που έχουν υποβληθεί θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών και έχουν αναπτύξει ακραία μεριστώματα μεταφέρονται στον ασηπτικό θάλαμο στο εργαστήριο
2. Από τα σπορόφυτα- υποκείμενα που αναπτύχθηκαν *in vitro*, αφαιρούνται οι κοτυληδόνες και τέμνεται το επικοτύλιο πάνω από τις κοτυληδόνες σε ύψος 2-3 cm. Η εργασία αυτή γίνεται κάτω από στερεοσκόπιο, μέσα στο θάλαμο συνεχούς οριζόντιας

ροής αποστειρωμένου αέρα (laminar flow). Αφαιρούνται επίσης, όλα τα πλάγια ριζίδια και η ρίζα 2 cm κάτω από τις κοτυληδόνες.

3. Στο πάνω μέρος του υποκειμένου χαράσσεται ένα ανάποδο T και εκεί τοποθετείται το μερίστωμα που αφαιρείται από τα μικρόφυτα που έχουν υποστεί θεραπεία χαμηλών θερμοκρασιών. Η εργασία αυτή γίνεται κάτω από στερεομικροσκόπιο με βοήθεια αποστειρωμένων μαχαιριδίων και λαβίδων.

4. Ακολούθως οι σωλήνες τοποθετούνται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (22-25 °C) και φωτοπερίοδο 16 ωρών.

5. Τα μικροεμβολιασμένα φυτά παρακολουθούνται καθημερινά 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.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΤΕΖΑΣ

Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (672 bp) των κυπριακών απομονώσεων του CTV που λήφθηκαν στην παρούσα μελέτη.

>CY-ARI1

```
ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAGAGAAGGCGACGATGTTGTTGCCGCTGAGTCTTCTTTCGGTTC
CTTAAACTTACACATCGATCCAACCTGATA
GCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAACACTGCTTAAACAGAGACTTATTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTACCTGACAAAGATAAGGACTTCCACTTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGATACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGATTTGCTGACAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCCAAGGGTATTGGCAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTACTTAGCTTTT
GTAGACAAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG
TTGAAGAAGCGAGGAGCTGATGAAGTTGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA
```

>CY-ARI2

```
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCGGTT
CTGTAACACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAATGTCGCTTGAACAGGGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAGGACTTCCACTTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAAITCTAAGGGTATCCGGTAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTATTAGCCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA
```

>CY-ARI3

```
ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACGGTGTGTAGCTGCCGAGTCTTCTTTCGGTTC
CGTAAACTTACACATCGATCCGACTTTGATA
ACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGCACCCAACAGAACGCTGCTTGAACAGAGACTTATTCCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTACCTGATAAAGATAAGGACTTCCACTTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGACGCCACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGATTTGTCTGATAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCTAAGGGTATTGGTAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTACTTAGCTTTT
GCAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGACGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTGTGTGCGGATTTCTTGACTGGAGCTGGTTTGACTGACTTAGAATGT
GCTGTGTACAAACAAGCTAAAGAACAATTG
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA
```

>CY-ARI4

```
ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTTCGGTTC
GTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAATGCTGCTTGAATAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCCAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGACTTCCACTTA
GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGACGATGATACCACGGGTGTGACGTACACTCGGGAAGTGT
GAAGTGGAGTTGTCTGACAACTTTGGACA
GACGTCGTGTTTAACTCTAAGGGTATTGGTAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTATTGGCTTTT
GTAGACAGAAACCGCAACTTGAGTTATGGT
GGACGTCGCTAGATGCAGGAATCCAGCCGGGTATCATTACTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCAGTGTACTTACAAGCTAAAGAGCTATTA
TTAAAGAAGCGAGGGGCTGATGAGTTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA
```

>CY-ARI5

```
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAGACGAAAGAAGGCGTCGATGTTGTTGCAGCAGAGTCTTCTTTCGGTTC
CATGAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGAACCCAACAGAACGCCGCTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTCTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTGCTGACAAAGATAAAGACTTCCACTTA
GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGGTGATGATGACGCCACGGGCATAACATATACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCTAAGGGTATTGGTAACCGTACTAATGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTATTAGCTTTCT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGT
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCTGGATATCATTACCTATGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA
```

>CY-ARI6

```
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAGACGAAAGAAGGCGTCGATGTTGTTGCAGCAGAGTCTTCTTTCGGTTC
CATGAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGAACCCAACAGAACGCCGCTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTCTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTGCTGACAAAGATAAAGACTTCCACTTA
```

GCTATGATGTTATATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCGTTGCAAGTGATGATGACGCCACGGGCATAACATATACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGATTTGTCTGACAAGCTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCTAACGGTATTGGTAACCGTACTAATGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCTTTCT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGT
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCTGGATATCATTACCTATGTGCAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI7

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCGTAAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAACCTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCTAACGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACC AATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI8

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCGTAAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAACCTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCTAACGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACC AATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI9

ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACGGTGTGTAGCTGCGGAGTCTTCTTCGGTTCT
CGTAAACTTACACATCGATCCGACTTTGATA
ACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAACGCTGCTTTGAACAGAGACTTATTCCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTACCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCGTAAAGTGATGACGACGCCACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGATTTGTCTGATAAAGGACTTTCACATA
GACGTCGTGTTTAACTCTAACGGTATTGGTAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT
GCAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGACGAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTGTGTGCGGATTCTTGACTGGAGCTGGTTTGACTGACTTAGAATGT
GCTGTGTACAAACAAAGCTAAAGAACAAATTG
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI10

ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACGATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTCGGTTCT
GTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAATGCTGCTTTGAATAGAGATTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCGTAAAGTGATGACGACGCCACGGGTGTGACGTACACTCGGGAAGGTGT
GAAGTGGAGTTGTCTGACAACCTTTGGACA
GACGTCGTGTTTAACTCTAACGGTATTGGTAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT
GTAGACAGAAACCGCAACTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGATGCAGGAATCCAGCCGGGTATCATTACTGTGTGCGGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCAGTGTACTTACAAGCTAAAGAGCTATTA
TTAAAGAAGCGAGGGGCTGATGAGTTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI11

ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAGAGAAGGCGACGATGTTGTTGCCGCTGAGTCTTCTTCGGTTCT
CTTAAACTTACACATCGATCCAACTCTGATA
GCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAACTGCTTTAAACAGAGACTTATTCCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACTTA
GCTATGATGTTGATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCGTAAAGTGATGACGACTACCGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGATTTGCTGACAACCTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCTAACGGTATTGGTAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT
GTAGACAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTGTGTGCGGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
TTGAAGAAGCGAGGAGCTGATGAAGTTCGTAGTTACC AATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI12

ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACGATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTCGGTTCT
GTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAATGCTGCTTTGAATAGAGATTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACATA

GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGACGATGATACCACGGGTGTGACGTACACTCGGGAAGGTGTT
 GAAGTGGAGTTGTCTGACAACTTTGGACA
 GACGTCGTGTTAACTCTAAGGGTATTGGTAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAGTAAACGATGCCCTTTATTGGCTTTT
 GTAGACAGAACCCGAACCTTGAGTTATGGT
 GGACGTCGGTTAGATGCAGGAATTCCAGCCGGTATCACTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
 GCAGTGTACTTACAAGCTAAAGAGCTATTA
 TTAAGAAGCGAGGGGCTGATGAGTTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATCAACACACGTTGA
 >CY-ARI13
 ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACGATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTTCGGTTC
 GTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
 GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAAATGCTGCTTGAATAGAGATTTGTTTCTTACCTTGAAAGGGAAGTATCCCAAC
 TTACCTGACAAAAGATAAAGACTTTCACATA
 GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGACGATGATACCACGGGTGTGACGTACACTCGGGAAGGTGTT
 GAAGTGGAGTTGTCTGACAACTTTGGACA
 GACGTCGTGTTAACTCTAAGGGTATTGGTAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAGTAAACGATGCCCTTTATTGGCTTTT
 GTAGACAGAACCCGAACCTTGAGTTATGGT
 GGACGTCGGTTAGATGCAGGAATTCCAGCCGGTATCACTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
 GCAGTGTACTTACAAGCTAAAGAGCTATTA
 TTAAGAAGCGAGGGGCTGATGAGTTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATCAACACACGTTGA
 >CY-ARI14
 ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCGGTT
 CCGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
 GCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCCAACAGAAATGCCGCTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAAT
 TTGCTGATAAAGATAAAGACTTTCACTTA
 GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGAGGGCGTC
 GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
 GACGTCGTGTTAATTCTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
 GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGT
 GGACGTCGGTTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGTATCATTACCTGTGTGACAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
 GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
 TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTTCGTAGTTACC AATGTCAGGCAGCTTGGGAAATCAACACACGTTGA
 >CY-ARI15
 ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCGGTT
 CCGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
 GCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCCAACAGAAATGCCGCTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAAT
 TTGCTGATAAAGATAAAGACTTTCACTTA
 GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGAGGGCGTC
 GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
 GACGTCGTGTTAATTCTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
 GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGT
 GGACGTCGGTTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGTATCATTACCTGTGTGACAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
 GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
 TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTTCGTAGTTACC AATGTCAGGCAGCTTGGGAAATCAACACACGTTGA
 >CY-ARI16
 ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCGGTT
 CTGTAACCTTACACATCGATCCGACTCTGATA
 GCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCCAACAGAAATGCCGCTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAAT
 TTGCTGATAAAGATAAAGACTTTCACTTA
 GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGAGGGCGTC
 GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
 GACGTCGTGTTAATTCTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
 GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGT
 GGACGTCGGTTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGTATCATTACCTGTGTGACAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
 GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
 TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTTCGTAGTTACC AATGTCAGGCAGCTTGGGAAATCAACACACGTTGA
 >CY-ARI17
 ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCGGTT
 CCGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
 GCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCCAACAGAAATGCCGCTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAAT
 TTGCTGATAAAGATAAAGACTTTCACTTA
 GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGAGGGCGTC
 GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
 GACGTCGTGTTAATTCTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
 GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGT
 GGACGTCGGTTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGTATCATTACCTGTGTGACAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
 GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
 TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTTCGTAGTTACC AATGTCAGGCAGCTTGGGAAATCAACACACGTTGA
 >CY-ARI18
 ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCGGTT
 CCGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
 GCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCCAACAGAAATGCCGCTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAAT
 TTGCTGATAAAGATAAAGACTTTCACTTA
 GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGAGGGCGTC
 GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
 GACGTCGTGTTAATTCTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
 GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGT
 GGACGTCGGTTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGTATCATTACCTGTGTGACAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
 GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
 TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTTCGTAGTTACC AATGTCAGGCAGCTTGGGAAATCAACACACGTTGA

GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI19

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAACAAAACAAAGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTCGGTT
CCGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCCAAACAGAATGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACCTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
GTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGT
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI20

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAACAAAACAAAGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTCGGTT
CCGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCCAAACAGAATGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACCTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
GTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGT
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTG
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI21

ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACAACAAAACAAAGAAACGAAAGAAAGGCGACGATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTCGGTT
GTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAAACAGAATGCTGCTTTGAATAGAGATTTGTTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCCAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGACTTTCACATA
GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAGCGACGATGATACCACGGGTGTGACGTACACTCGGGAAGGTGTT
GAAGTGGAGTTGTCTGACAACTTTGGACA
GACGTCGTGTTTAACTTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAGTAAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
GTAGACAGAACCGCAACTTGAGTTATGGT
GGACGTCGCTAGATGCAGGAATTCAGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCAAGTACTTACAAGCTAAAGAGCTAATTA
TTAAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI22

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAACAAAACAAAGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAAACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTTGTTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
GTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI23

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAACAAAACAAAGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAAACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTTGTTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
GTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI24

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAACAAAACAAAGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAAACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTTGTTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTAGCCTTTT
GTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI25
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACA AAAAACAAAGGAAACGAAAGAAAGACGACAATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTTCCGGTTC
GTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAAACAGAATGCTGCTTTGAATAGAGATTGTTTCTACCTTGAAAGGGAAGTATCCCAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGACTTTCACATA
GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTAACAAAGCGACGATGATACCACGGGTGTGACGTACACTCGGGAAGGTGTT
GAAGTGGAGTTGCTGACAAACTTTGGACA
GACGTCGTGTTAACTCTAAGGGTATTGGTAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTGAAGTAAACGATGCCCTTTATTTGGCTTTTT
GTAGACAGAACCCGCAACTTGAGTTATGGT
GGACGTCCTGATGATGCAGGAATCCAGCCGGTATCCTACTCTGTGTGCAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCAGTGTACTACAAGCTAAAGAGCAATTA
TTAAAGAAGCGAGGGGCTGATGAGTCTGATGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI26
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACA AAAAACAAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCCGGTTC
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAAACAGAATGCTGCTTTGAACAGGGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTAACAAAGTGTGACGACACTACGGGTATACGTAACACTCGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGCTGACAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTAACTCTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCTGATGATGCAGGGATTCCGGCCGGTATCATTACTCTGTGTGCGGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCTGATGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI27
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACA AAAAACAAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTCCGGTTC
CGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
ACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGCTTTGAACAGGGACTTATTTCTTGTCTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTGCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTATACCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTAACAAAGTGTGACGACACTACGGGATAACGTAACACTCGGAGGGGTGTT
GAAGTAGATTTGCTGACAAACTTTGGACC
GACATCGTGTAT AATTCTAAGGGTATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTGAAGTAAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTTT
GTAGACAGAACCCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCTGATGATGCAGGGATTCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGTG
CTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAAAGCGAGGGGCTGATGAGTGTGATGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI28
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACA AAAAACAAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTCCGGTTC
CGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
ACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGCTTTGAACAGGGACTTATTTCTTGTCTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTGCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTATACCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTAACAAAGTGTGACGACACTACGGGATAACGTAACACTCGGAGGGGTGTT
GAAGTAGATTTGCTGACAAACTTTGGACC
GACATCGTGTAT AATTCTAAGGGTATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTGAAGTAAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTTT
GTAGACAGAACCCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCTGATGATGCAGGGATTCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGTG
CTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAAAGCGAGGGGCTGATGAGTGTGATGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI29
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACA AAAAACAAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTCCGGTTC
CGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
ACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGCTTTGAACAGGGACTTATTTCTTGTCTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTGCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTATACCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTAACAAAGTGTGACGACACTACGGGATAACGTAACACTCGGAGGGGTGTT
GAAGTAGATTTGCTGACAAACTTTGGACC
GACATCGTGTAT AATTCTAAGGGTATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTGAAGTAAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTTT
GTAGACAGAACCCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCTGATGATGCAGGGATTCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGTG
CTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAAAGCGAGGGGCTGATGAGTGTGATGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI30
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACA AAAAACAAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTCCGGTTC
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAAACAGAATGCTGCTTTGAACAGGGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTAACAAAGTGTGACGACACTACGGGTATACGTAACACTCGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGCTGACAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTAACTCTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCTGATGATGCAGGGATTCCGGCCGGTATCATTACTCTGTGTGCGGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCTGATGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI31
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACA AAAAACAAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTCCGGTTC
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA

GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTGTTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTGTGTGCGGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI32

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTGTTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTGTGTGCGGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI33

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGACGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGACGACAATGTTGTTGCCGCTGAGTCTTCTTCGGTTT
CTTAAACTTACACATCAATCCAACCTCTGATA
GCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAACGCTGCTTTAAACAGAGACTTATTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACTTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGATACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGAAATTGCTGACAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCAAGGGTATTGGCAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTACTTACTGTTTTT
GTAGACAAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTGTGTGACAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATG
TTGAAGAAGCGAGGAGCTGATGAAGTTGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI34

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGACGAACAAAAACAAGGAAACGGAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCCGCTGAGTCTTCTTCGGTTT
CTTAAACTTACACATCAATCCAACCTCTGATA
GCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAACGCTGCTTTAAACAGAGACTTATTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACTTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGATACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGAAATTGCTGACAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCAAGGGTATTGGCAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTACTTACTGTTTTT
GTAGACAAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTGTGTGACAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATG
TTGAAGAAGCGAGGAGCTGATGAAGTTGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI35

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGACGAACAAAAACAAGGAAACGGAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCCGCTGAGTCTTCTTCGGTTT
CTTAAACTTACACATCAATCCAACCTCTGATA
GCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAACGCTGCTTTAAACAGAGACTTATTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACTTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGATACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGAAATTGCTGACAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCAAGGGTATTGGCAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTACTTACTGTTTTT
GTAGACAAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTGTGTGACAGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATG
TTGAAGAAGCGAGGAGCTGATGAAGTTGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI36

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTGTTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTTAAGGGTATCGGTAAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTGTGTGCGGATTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI37

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTGTTTCTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAAACTTTGGACT

GACGTCGTGTTAATTCTAAGGGTATCGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTAACACACGTTGA

>CY-ARI38

ATGGACGACGAAACAAAGAAATGAAGAACA AAAACA AAGGAAACGAAAG AAGGCGACGATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTTCCGGTTC
GTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCC AACAGAATGCTGCTTTGAATAGAGATTTGTTTCTTACCTTGAAAGGGAAGTATCCCAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGACTTTCACATA
GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGACGATGATACCACGGGTGTGACGTACACTCGGGAAGTGT
GAAGTGGAGTTGTCTGACAACTTTGGACA
GACGTCGTGTTA AACTCTAAGGGTATTGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTATTTGGCTTTT
GTAGACAGAACCCGCAACTTGAGTTATGGT
GGACGTCCGTTAGATGCAGGAATCCAGCCGGGTATC ACTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCAGTGTACTTACAAGCTAAAGAGCTATTA
TTAAAGAAGCGAGGGGCTGATGAGTTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTAACACACGTTGA

>CY-ARI39

ATGGACGACGAAACAAAGAAATGAAGAACA AAAACA AAGGAAACGAAAG AAGGCGACGATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTTCCGGTTC
GTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCC AACAGAATGCTGCTTTGAATAGAGATTTGTTTCTTACCTTGAAAGGGAAGTATCCCAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGACTTTCACATA
GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGACGATGATACCACGGGTGTGACGTACACTCGGGAAGTGT
GAAGTGGAGTTGTCTGACAACTTTGGACA
GACGTCGTGTTA AACTCTAAGGGTATTGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTATTTGGCTTTT
GTAGACAGAACCCGCAACTTGAGTTATGGT
GGACGTCCGTTAGATGCAGGAATCCAGCCGGGTATC ACTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCAGTGTACTTACAAGCTAAAGAGCTATTA
TTAAAGAAGCGAGGGGCTGATGAGTTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTAACACACGTTGA

>CY-ARI40

ATGGACGACGAAACAAAGAAATGAAGAACA AAAACA AAGGAAACGAAAG AAGGCGACGATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTTCCGGTTC
GTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCC AACAGAATGCTGCTTTGAATAGAGATTTGTTTCTTACCTTGAAAGGGAAGTATCCCAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGACTTTCACATA
GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGACGATGATACCACGGGTGTGACGTACACTCGGGAAGTGT
GAAGTGGAGTTGTCTGACAACTTTGGACA
GACGTCGTGTTA AACTCTAAGGGTATTGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTATTTGGCTTTT
GTAGACAGAACCCGCAACTTGAGTTATGGT
GGACGTCCGTTAGATGCAGGAATCCAGCCGGGTATC ACTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCAGTGTACTTACAAGCTAAAGAGCTATTA
TTAAAGAAGCGAGGGGCTGATGAGTTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTAACACACGTTGA

>CY-ARI41

ATGGACGACGAAACAAAGAAATGAAGAACA AAAACA AAGGAAACAAAAG AAGGCGACGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCC AACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTA AACTCTAAGGGTATCGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTAACACACGTTGA

>CY-ARI42

ATGGACGACGAAACAAAGAAATGAAGAACA AAAACA AAGGAAACAAAAG AAGGCGACGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCC AACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTA AACTCTAAGGGTATCGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTAACACACGTTGA

>CY-ARI43

ATGGACGACGAAACAAAGAAATGAAGAACA AAAACA AAGGAAACAAAAG AAGGCGACGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCC AACAGAATGTCGCTTTGAACAGGGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAGTGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGAGGGCGTC
GAAGTGGAAATTGTCTGACAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTA AACTCTAAGGGTATCGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCGGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTAACACACGTTGA

TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI44

ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACA AAAAC AAGGAAACGAAAGAAGGCGACGGTGTGTAGCTGCCGAGTCTTCTTTCCGGCTC
CGTAAACTTACACATCGATCCGACTTTGATA
ACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGCACCC AACAGAACGCTGCTTTGAACAGAGACTTATTCCTTACTTTGAAAGGGAAGTGTCTAAC
TTACCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGACGCCACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGATTTGTCTGATAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCTAAGGGTATTGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTACTTAGCTTTTT
GCAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGACGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGCGGATTTCTTGACTGGAGCTGGTTTACTGACTTAGAATGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI45

ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACA AAAAC AAGGAAACGAAAGAAGGCGACGGTGTGTAGCTGCCGAGTCTTCTTTCCGGCTC
CGTAAACTTACACATCGATCCGACTTTGATA
ACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGCACCC AACAGAACGCTGCTTTGAACAGAGACTTATTCCTTACTTTGAAAGGGAAGTGTCTAAC
TTACCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGACGCCACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGATTTGTCTGATAAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCTAAGGGTATTGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTACTTAGCTTTTT
GCAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGACGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGCGGATTTCTTGACTGGAGCTGGTTTACTGACTTAGAATGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI46

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACA AAAAC AAGGAAACGAAAGAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCC AACAGAAATGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACTTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
GACATCGTGTTTAATTCTAAGGGTATCGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGCGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI47

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACA AAAAC AAGGAAACGAAAGAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCC AACAGAAATGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACTTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
GACATCGTGTTTAATTCTAAGGGTATCGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGCGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI48

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACA AAAAC AAGGAAACGAAAGAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTCCGGTT
CTGTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
GCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCC AACAGAAATGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAAT
TTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACTTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC
GAAGTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACT
GACATCGTGTTTAATTCTAAGGGTATCGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTATTTAGCCTTTT
GTAGACAGAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGCGTCCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI49

ATGGACGACGAAACAAAGACATTGAAGAACA AAAAC AAGGAAACGAGAGAAGGCGACGATGTTGTTGCCGCTGAGTCTTCTTTCCGGTT
CTTAAACTTACACATCGATCAACTCTGATA
GCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACCC AACAGAACTGCTTTAAACAGAGACTTATTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAAC
TTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACTTA
GCTATGATGTTGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGATACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGT
GAAGTGGATTTGCCCTGACAACTTTGGACT
GACGTCGTGTTTAACTCCAAGGGTATTGGCAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTACTTAGCTTTTT
GTAGACAAATCGCAATTTGAGTTATGGC
GGACGTCGCTAGATGCAGGGATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
GCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAAATTA
TTGAAGAAGCGAGGAGCTGATGAAGTGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

>CY-ARI50

ATGGACGACGAAACAAGACATTG AAGAACA AAAAAC AAGGAAACGAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTCCGGTTCC
 GTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA
 GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCC AACAGAATGCTGCTTTGAATAGAGATTTGTTTCTTACCTTGAAGGGAAGTATCCCAAC
 TTACCTGACAAAGATAAAGACTTTCACATA
 GCTATGATGTTATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGACGATGATACCACGGGTGTGACGTACTCGGGAAGGTGTT
 GAAGTGGAGTTGTCTGACAAAACTTGGACA
 GACGTCGTGTTTAACTCTAAGGGTATTGGT AACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTATTGGCTTTTT
 GTAGACAGAACCACAACCTTGAGTTATGGT
 GGACGTCGGTTAGATGCGAGGAATCCAGCCGGGTATCCTACTCTGTGTGCCGATTCTTG ACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGT
 GCAGTGTACTACAAGCTAAAGAGCTATTA
 TTAAGAAGCGAGGGGCTGATGAGGTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACACGTTGA

Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδιακών αλληλουχιών απομονώσεων του CTV από την Κύπρο

	ATGGACGACGAAACAAGA	ATTCGAGACAAAACAAGGaaACgaaAGAAgGcGac	aTGTGTcGC GC	GAGTCTCTTCGGcTC	TaaACTTACACATCGATCCGACTcTGAATAgCGATGAACGatGTCCGTcAGTTGgGcACcCACAGAA g	GCITTTgAA		
CY-ARI1C.....G.....G.....C..T.....T.....T..C.....CA.T.....	: 170
CY-ARI2C.....GG.....A..T..C.....T.....T.....C.....C..T.....	: 170
CY-ARI3C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI4C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI5C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI6C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI7C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI8C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI9C.....GG.....A..T..C.....T.....T.....C.....C..T.....	: 170
CY-ARI10C.....G.....C..T.....T.....A.....T..C.....CA.T.....	: 170
CY-ARI11C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI12C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI13C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI14C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI15C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI16C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI17C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI18C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI19C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI20C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI21C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI22C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI23C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI24C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI25C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI26C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI27C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI28C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI29C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI30C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI31C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI32C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI33C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI34C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI35C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI36C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI37C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI38C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI39C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI40C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI41C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI42C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI43C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI44C.....GG.....A..T..C.....C.....T.....C.....C..T.....	: 170
CY-ARI45C.....GG.....A..T..C.....C.....T.....C.....C..T.....	: 170
CY-ARI46C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI47C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI48C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI49C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170
CY-ARI50C.....G.....T.....GT.....T.....T.....T.....	: 170


```

*           *           150           *           *           *           *           200           *           *
SKGIGNRTNALRVWGRNDALYLAFRCRQNRNLSYGGREFLDAGIFAGYHYLCADFLTGAGLTDLLECAVY QAKEqLKKRGADEVVVVTVNRQLGKENTR
CY-ARI1 : ..... : 223
CY-ARI2 : ..... : 223
CY-ARI3 : .....K..... : 223
CY-ARI4 : .....L..L..... : 223
CY-ARI5 : .N..... : 223
CY-ARI6 : .N..... : 223
CY-ARI7 : ..... : 223
CY-ARI8 : ..... : 223
CY-ARI9 : .....K..... : 223
CY-ARI10 : ..... : 223
CY-ARI11 : .....L..L..... : 223
CY-ARI12 : .....L..L..... : 223
CY-ARI13 : .....L..L..... : 223
CY-ARI14 : .....L..L..... : 223
CY-ARI15 : ..... : 223
CY-ARI16 : ..... : 223
CY-ARI17 : ..... : 223
CY-ARI18 : ..... : 223
CY-ARI19 : ..... : 223
CY-ARI20 : ..... : 223
CY-ARI21 : .....L..L..... : 223
CY-ARI22 : .....L..L..... : 223
CY-ARI23 : ..... : 223
CY-ARI24 : ..... : 223
CY-ARI25 : .....L..... : 223
CY-ARI26 : ..... : 223
CY-ARI27 : ..... : 223
CY-ARI28 : ..... : 223
CY-ARI29 : ..... : 223
CY-ARI30 : ..... : 223
CY-ARI31 : ..... : 223
CY-ARI32 : ..... : 223
CY-ARI33 : ..... : 223
CY-ARI34 : ..... : 223
CY-ARI35 : ..... : 223
CY-ARI36 : ..... : 223
CY-ARI37 : ..... : 223
CY-ARI38 : .....L..L..... : 223
CY-ARI39 : .....L..L..... : 223
CY-ARI40 : .....L..L..... : 223
CY-ARI41 : ..... : 223
CY-ARI42 : ..... : 223
CY-ARI43 : ..... : 223
CY-ARI44 : ..... : 223
CY-ARI45 : ..... : 223
CY-ARI46 : ..... : 223
CY-ARI47 : ..... : 223
CY-ARI48 : ..... : 223
CY-ARI49 : ..... : 223
CY-ARI50 : .....L..L..... : 223

```

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3.

3.1 Δημοσιεύσεις

1. Kapari-Isaia T., Voloudakis A.E., Kyriakou A., Ioannides I., Papayiannis L., Samouel S., Koutsiumari 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.
2. Varveri Chr. , Maliogka V, Kapari Th. 2015. Principles for Supplying Virus-Tested Material. *Advances in Virus Research* 91(1):1-32.

3.2. Εργασίες σε Συνέδρια

1. Kyriakou, A., Kapari-Isaia, T., Papayiannis, L. C., Hadjinicolis, A., Polycarpou, D., Hadjinicoli, A., Ioannou, N., 2008. Virus, virus-like and other diseases of citrus in Cyprus. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 154.
2. Papayiannis, L. C., Kapari-Isaia, T., Kyriakou, A., 2008. Characterization of Citrus tristeza virus (CTV) isolates from Cyprus. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 158.
3. Th. Kapari-Isaia, A. Voloudakis, A. Kyriakou, I. Ioannides, L. Papayiannis, S. Samuel, E. Koutsiumari, A. Georgiou and G. Minas. 2009. Sanitation of citrus varieties and/or clones by micrografting in vitro in Cyprus and Greece. *Second Int. Citrus Biotechnology Symposium- Catania Italy* p. 137.
4. Papayiannis L.C., Theodora Kapari-Isaia, Anastasia Kyriakou and Aikaterini Demoliou 2009. Implementation of modern diagnostic techniques for the detection of plant pathogens. *Proceedings of the 24th Hellenic Society for Horticultural Science*, p.162 October 7-10, 2009. Veria, Greece.
5. Vogiatzaki E. Doulis A. Georgiou A., kapari T., Protopapadakis E. 2010. Epigenetic differentiation of clonal Citrus plants employing methylation sensitive molecular markers. Book of Abstracts of the 61st Annual Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology, October 15-17 2010 Alexandroupoli, Greece.

- 6.Kapari-Isaia, Theodora, Anastasia Kyriacou, G. Gavriel, G. Savva, L.C. Papayiannis, and N. Ioannou. 2010. Citrus tristeza virus in Cyprus. Proceedings of the 15th Pan-Hellenic Phytopathological Conference, p.100. October 5-8, 2010. Corfu, Greece.
- 7.Papayiannis, L.C., Theodora Kapari-Isaia, and Anastasia Kyriakou. 2010. Real-time polymerase chain reaction applications in plant pathogens diagnostics. Proceedings of the 15th Pan-Hellenic Phytopathological Conference, p.164. October 5-8, 2010. Corfu, Greece.
- 8.Papayiannis, L.C., Anastasia Kyriakou, and Theodora Kapari-Isaia. 2010. Genetic variation of Citrus tristeza virus in Cyprus. Proceedings of the 15th Pan-Hellenic Phytopathological Conference, p.181. October 5-8, 2010. Corfu, Greece.
- 9.Καπαρή-Ησαΐα Θ., Κυριακού Α., Ιωάννου Ν., Γαβριήλ Ι., Σάββας Γ. και Παπαγιάννης Α. 2011. Εικοσαετής σχέδιο για αντιμετώπιση του ιού της τριστέζας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο, 1991-2011. Πρακτικά Περιλήψεων 25^{ου} Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, Λεμεσός, σελ. 153.
- 10.Καπαρή-Ησαΐα Θ., Πρωτοπαπαδάκης Ε., Σαμουήλ Στ., Γεωργίου Α., Ντούλης Α. και Κυριακού Α. 2011. Μικροπολλαπλασιασμός πέντε νέων υποκειμένων-υβριδίων νεραντζιάς *in vitro*. Πρακτικά 24^{ου} Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, Βέροια, σελ. 237-241.
- 11.Καπαρή-Ησαΐα Θ., Παπαγιάννης Α.Χ., Κυριακού Α. 2014. Αξιολόγηση έξι υποκειμένων εσπεριδοειδών για ανεκτικότητα στον ιό της τριστέτσας. 17^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Βόλος 13-17 Οκτωβρίου 2012, Περιλήψεις σελ.137.
- 12.Παπαγιάννης Α.Χ., Καπαρή-Ησαΐα Θ. 2014. Χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστέτσας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο με τη χρήση μοριακών τεχνικών στην Κύπρο. 17^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Βόλος 13-17 Οκτωβρίου 2012, Περιλήψεις σελ.139
13. Καπαρή-Ησαΐα Θ., Παπαγιάννης Α.Χ., Κυριακού Α., Βολουδάκης Α.Ε., Τσάλτας Δ. και Ιωάννου Ν. 2014. Εξυγίανση του ιού της τριστέτσας των εσπεριδοειδών με μεθόδους θερμοθεραπείας, χημειοθεραπείας και μικροεμβολιασμού *in vitro*. 17^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Βόλος 13-17 Οκτωβρίου 2012, Περιλήψεις σελ.138.

14.Καπαρή-Ησαΐα Θ., Παπαγιάννης Λ.Χ., Κυριακού Α., Βολουδάκης Α.Ε., Τσάλτας Δ. και Ιωάννου Ν. 2014. Βιολογική ανίχνευση του ιού της τριστεύσσας των εσπεριδοειδών *in vitro*. 17^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Βόλος 13-17 Οκτωβρίου 2012, Περιλήψεις σελ.136.

15. Καπαρή-Ησαΐα Θ., Παπαγιάννης Λ.Χ., Κυριακού Α., και Ιωάννου Ν. 2014. Επισκοπήσεις και αντιμετώπιση του ιού της τριστεύσσας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο. 17^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Βόλος 13-17 Οκτωβρίου 2012, Περιλήψεις σελ.135.

3.3. Διαλέξεις-Ενημερωτικά δελτία ΙΓΕ-Περιοδικά

1. Αντιμετώπιση του ιού της τριστεύσσας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο, 14/4/2010, Λευκωσία.

2. Ιώσεις και άλλες ασθένειες εσπεριδοειδών. 26 Νοεμβρίου, 2010, Λεμεσός.

3. Χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού της τριστεύσσας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο και αντιμετώπισης του. 28 Σεπτεμβρίου, 2011, Λεμεσός.

4. Σχέδιο για Αντιμετώπιση του ιού της τριστεύσσας των εσπεριδοειδών στην Κύπρο. 12/4/2011 ΜΑΙCΗ Χανιά, Κρήτη.

5. Πενήντα χρόνια έρευνας στη Φυτοπαθολογία στο ΙΓΕ. 20.12.2012 Λευκωσία

6. Αντιμετώπιση του Ιού της Τριστεύσσας των Εσπεριδοειδών στην Κύπρο, 1991-2013. Ναύπλιο, Ιούλιος 2013.

7. Μέθοδοι εξυγίανσης φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού. 15 Οκτωβρίου, 2015.

8. Καπαρή Ησαΐα Θ. 2011. Εξυγίανση ποικιλιών και κλώνων εσπεριδοειδών με μεριστωματικό μικροεμβολιασμό *in vitro*. Γεωργικά νέα. Τεύχος Μαΐου-Ιουνίου. Σελ. 15-16.

9. Λ. Χ. Παπαγιάννης και Θ. Καπαρή-Ησαΐα. 2015. Ιοειδή: τα μικροσκοπικά αλλά δυναμικά παθογόνα των φυτών. Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών. 30 σελίδες.

10. Θ. Καπαρή-Ησαΐα και Λ. Χ. Παπαγιάννης. Εξυγίανση και Παραγωγή Υγιούς Πολλαπλασιαστικού Υλικού δεινδρωδών καλλιεργειών (υπό δημοσίευση).

Λευκωσία.

