

92/2129

ΜΑΡΙΑΣ ΑΝΑΓΝΟΥ - ΒΕΡΟΝΙΚΗ
ΕΠΙΜΕΛΗΤΡΙΑΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΕΝΤΟΜΩΝ
ΤΟΥ ΜΠΕΝΑΚΕΙΟΥ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΙΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ
DACUS OLEAE (GMELIN) ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΓΕΩΡΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΑΘΗΝΑ 1992

Η έγκριση της παρούσας διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα
Φυτικής Παραγωγής του Γεωργικού Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν
υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.
(Ν. 5343/1932 άρθρ. 202 παρ. 2)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή έχει ως αντικείμενο τη μελέτη των ιώσεων του δάκου της ελιάς με απώτερο στόχο τη διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης τους για την αντιμετώπιση του σοβαρού αυτού εντομολογικού εχθρού. Η ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε τμηματικά από το 1980 έως το 1988 στο Station de Recherches de Pathologie Comparee του INRA-CNRS στο Saint-Christol-lez-Ales της Γαλλίας καθώς και στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παθολογίας Εντόμων του Τμήματος Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Πριν από την παρουσίαση της εργασίας επιθυμώ να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στη πραγματοποίησή της και με βοήθησαν με οποιοδήποτε τρόπο.

Εκφράζω τη βαθειά μου ευγνωμοσύνη και εκτίμηση στον Καθηγητή ΧΡ. ΓΙΑΜΒΡΙΑ Διευθυντή του Εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γ.Π.Α., ο οποίος ως Προϊστάμενος του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Παθολογίας Εντόμων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου με βοήθησε στον επιστημονικό μου προσανατολισμό και καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας με καθοδήγησε με την υποδειγματική επιστημονική του κατάρτιση. Ακόμη θεωρώ τιμή μου ότι ανέλαβε την εισήγηση αυτής της διατριβής και για το λόγο αυτό τον ευχαριστώ.

Στον Ακαδημαϊκό C. VAGO, Καθηγητή του Πανεπιστημίου του Montpellier και Διευθυντού, στο Station de Recherches de Pathologie Comparee, που δέχτηκε να εργαστώ εκεί μου έδωσε τις αναγκαίες κατευθύνσεις και δεν σταμάτησε να με συμβουλεύει σε όλες τις φάσεις της εργασίας μου, απευθύνω την βαθειά αναγνώριση και τον ειλικρινή σεβασμό μου.

Στον Καθηγητή Συγκριτικής Παθολογίας του Πανεπιστημίου του Montpellier και Προϊστάμενο του Εργαστηρίου Ιολογίας M. BERGOIN, όπου και εργάστηκα, εκφράζω όλες μου τις ευχαριστίες και την αναγνώριση της προσφοράς του. Οι ανεξάντλητες γνώσεις του στον τομέα της Ιολογίας και το σταθερό ενδιαφέρον για την ερευνητική μου εργασία, συνέβαλαν πολύ στην ανάπτυξή της. Η ερευνητική εμπειρία που αποκόμισα κατά την παραμονή μου στο Εργαστήριο καθώς και ο χρόνος που διάθεσε για την καθοδήγησή μου, δημιουργούν ευγνώμονη ανάμνηση και βαθειά ειλικρινή εκτίμηση.

Στους καθηγητές κ.κ. MIX. ΚΑΡΑΝΔΕΙΝΟ, Διευθυντή του Εργαστηρίου Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος του Γ.Π.Α., ΧΡ. ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟ, Διευθυντή του Εργαστηρίου

φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α., μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ι. ΤΣΙΤΣΙΠΗ και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Εφαρμοσμένης Ζωολογίας και Παρασιτολογίας του Α.Π.Θ. Β. ΚΑΤΣΟΓΙΑΝΝΟ, που δέχτηκαν να λάβουν μέρος ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής εκφράζω τις ευχαριστίες μου.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στη Διεύθυνση του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου που μου παρείχε την ηθική και υλική βοήθεια κατά την διάρκεια της εργασίας. Στους διάφορους φορείς και οργανισμούς που ενέκριναν και χρηματοδότησαν τις μεταβάσεις μου στα Ερευνητικά και Πανεπιστημιακά Ιδρύματα του εξωτερικού, όπως τη Διεύθυνση Προστασίας Φυτών του Υπουργείου Γεωργίας, τη Γενική Γραμματεία Ερευνας και Τεχνολογίας του Υπουργείου Βιομηχανίας Ενέργειας και Τεχνολογίας, τον FAO/UNDP και το συντονιστή του προγράμματος του Directorate - General for Agriculture της C.E.C. Καθηγητή R. CAVALLORO.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα που με βοήθησαν στα χρονικά διαστήματα της παραμονής μου στη Γαλλία, στα ερευνητικά εργαστήρια που εργάστηκα.

Ευχαριστίες για τη βοήθεια του απευθύνω στον J.C. VEYRUNES, Χημικό-Τεχνικό του INRA, που με καθοδήγησε σε πολλές Ιολογικές μεθόδους, συνεργάστηκε σε πολλούς σημαντικούς τομείς και επέδειξε φιλική συμπεριφορά και πνεύμα συνεργασίας.

Απευθύνω ευχαριστίες ακόμη, στο Επιστημονικό, Τεχνικό και Διοικητικό προσωπικό με το οποίο συνεργάστηκα και ιδιαίτερα στην F.X. JOUSSET, στους G. CROIZIER και C. LOUIS, ερευνητές, στην υπεύθυνη της βιβλιοθήκης C. ROURE για τη βοήθεια της στη συγκέντρωση της βιβλιογραφίας, στους Τεχνικούς, κα Α. KUHL για την εκμάθηση της τεχνικής εμβολιασμού των εντόμων και τη ζεστή φιλοξενία της, στον G. KUHL για τη βοήθεια του στον τομέα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και τη συμβολή του στην εμφάνιση των φωτογραφιών καθώς και στις Y. SERRE, N. BRES, A.M. TRAVIER και τους λοιπούς που με καθιολογήσαν με τρόπο συμπαραστάθηκαν.

Ακόμη δεν θα ξεχάσω πολλές προσωπικότητες της επιστήμης που γνώρισα από τους επισκέπτες του Station του St. Christol που με διάφορες συζητήσεις διεύρυναν τις γνώσεις μου στον Τομέα της Παθολογίας των Εντόμων, καθώς και τους συναδέλφους μετεκπαιδευόμενους και μεταπτυχιακούς από όλο τον κόσμο που δημιουργούσαν ατμόσφαιρα αλληλεγγύης και αντιμετώπισης των δυσκολιών.

Αξιόλογη βοήθεια στην εργασία μου υπήρξε η χορήγηση εντομολογικού υλικού από τις εκτροφές δάκου του Εργαστηρίου Εντομολογίας του ΕΚΕΦΕ "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ" και ευχαριστώ όλους τους αρμόδιους επιστήμονες καθώς και το τεχνικό προσωπικό.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στον Καθηγητή Ι. ΤΣΙΤΣΙΠΗ που είχε την καλοσύνη να διαθέσει τον απαιτούμενο χρόνο για να μελετήσει τα χειρόγραφα και να κάνει χρήσιμες υποδείξεις για τη βελτίωση του κειμένου.

Για την τεχνική βοήθεια στις εκτροφές του Εργαστηρίου εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην διδα ΣΤ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ και το λοιπό προσωπικό. Επίσης τους συναδέλφους του Ινστιτούτου για τη συμπαράστασή τους και τη βοήθειά τους, όποτε χρειάστηκε.

Τέλος οι σκέψεις μου στρέφονται στην οικογένειά μου, που με την αμέριστη συμπαράσταση, την υπομονή και την ενθάρρυνση που μου πρόσφεραν, άντλησα δυνάμεις που έκαναν δυνατή την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
SUMMARY.....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1.1. Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	
1.1. Εισαγωγή.....	9
1.1.1. <u>Το οικονομικό ενδιαφέρον της ελαιοκαλλιέργειας για την Ελλάδα</u>	9
1.1.2. <u>Η φυτοφάγος πανίδα των αρθροπόδων στους ελαιώνες</u>	10
1.1.3. <u>Dacus (Bactrocera) oleae (Gmelin)</u>	12
1.1.3.1. Συστηματική κατάταξη.....	12
1.1.3.2. Γεωγραφική κατανομή.....	12
1.1.3.3. Μορφολογική περιγραφή.....	12
1.1.3.4. Βιολογικός κύκλος.....	13
1.1.3.5. Παρασιτισμός.....	14
1.1.3.6. Καταπολέμηση.....	14
1.1.4. <u>Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με το δάκο της ελιάς</u>	15
1.1.4.1. Συμβιωτικά βακτήρια.....	16
1.1.4.2. Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	17
1.1.4.2.1. Βακτήρια.....	17
1.1.4.2.2. Μύκητες.....	17
1.1.4.2.3. Πρωτόζωα.....	18
1.1.4.2.4. Ιοί.....	18
1.2. ΟΙ ΙΟΙ	
1.2. Εισαγωγή.....	19
1.2.1. <u>Γενικά για τους ιούς των ασπονδύλων</u>	19
1.2.2. <u>Οι κυριότερες ομάδες ιών των ασπονδύλων</u>	21
1.2.2.1. Ιοί με DNA.....	21
1.2.2.1.1. Οι Entomovirus.....	21
1.2.2.1.2. Οι Baculovirus.....	22
1.2.2.1.3. Οι Iridovirus.....	25
1.2.2.1.4. Οι Densovirus.....	26
1.2.2.2. Ιοί με RNA.....	26
1.2.2.2.1. Οι Rhabdovirus.....	26
1.2.2.2.2. Οι Picornavirus.....	26
1.2.2.2.3. Οι Nodavirus.....	27
1.2.2.2.4. Οι Reovirus.....	27
1.2.3. <u>Ιοί της οικογένειας των Reoviridae</u>	27
1.2.3.1. Διάφορες ομάδες των Reovirus.....	28
1.2.3.1.1. Οι Reovirus.....	28
1.2.3.1.2. Οι Orbivirus.....	28
1.2.3.1.3. Οι Rotavirus.....	28

1.2.3.1.4.	Οι Phytoreovirus.....	29
1.2.3.1.5.	Οι Fijiivirus.....	29
1.2.3.1.6.	Οι Cyrovirus ή ιοί της Κυττοπλασμικής πολυέδρωσης.....	29
1.2.3.1.7.	Οι μη εγκλεισμένοι ιοί τύπου Reovirus στα ασπόνδυλα.....	30
1.2.3.2.	Ιοί του τύπου Reovirus που έχουν παρατηρηθεί στα ασπόνδυλα (εκτός εντόμων).....	30
1.2.3.3.	Ιοί του τύπου Reovirus που έχουν παρατηρηθεί στα έντομα.....	31
1.2.4.	<u>Ιοί των διπτέρων</u>	31

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	33
2.1. ΤΟ ΕΜΒΙΟ ΥΛΙΚΟ.....	33
2.1.1. Προέλευση των εντόμων.....	33
2.1.2. <u>Εργαστηριακή εκτροφή</u>	34
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ.....	37
2.2.1. <u>Τεχνική μόλυνσεως</u>	37
2.2.1.1. Μόλυσμα.....	37
2.2.1.2. Μόλυνση <i>per os</i>	38
2.2.1.3. Μόλυνση με έγχυση.....	38
2.2.2. <u>Αναζήτηση και απομόνωση ιών</u>	43
2.2.2.1. Σε φυσικούς πληθυσμούς του <i>D. oleae</i>	43
2.2.2.2. Αναζήτηση ιών σε αποχωρήματα εντόμων.....	44
2.2.2.3. Μελέτη της επίδρασης ιών στη βιοσιμότητα του ξενιστή.....	44
2.3. ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	44
2.3.1. <u>Οπτική μικροσκοπία</u>	44
2.3.2. <u>Ηλεκτρονική μικροσκοπία</u>	45
2.3.2.1. Αρνητική χρώση ιολογικών αιωρημάτων.....	45
2.3.2.2. Προσήλωση και εγκλεισμός ιστών.....	45
2.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΩΝ.....	46
2.5. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	46
2.5.1. <u>Φασματομετρική ανάλυση</u>	46
2.5.2. <u>Χρωματομετρικές αναλύσεις</u>	47
2.5.3. <u>Ηλεκτροφόρηση γονιδιώματος σε πήγμα πολυακρυλαμίδης</u>	47

3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	49
3.1. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΕΝΟΣ ΙΟΥ ΤΥΠΟΥ REOVIRUS ΣΤΟ ΔΑΚΟ.....	50
3.1.1. <u>Εισαγωγή</u>	50
3.1.2. <u>Υλικά και μέθοδοι</u>	50
3.1.3. <u>Αποτελέσματα</u>	53
3.2. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ.....	53
3.2.1. <u>Εισαγωγή</u>	53
3.2.2. <u>Υλικά και μέθοδοι</u>	54
3.2.3. <u>Αποτελέσματα</u>	54
3.2.3.1. Ανεύρεση Reo-ιών σε φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου..	54
3.2.3.2. Παρουσία δύο άλλων μικρών ιών στους φυσικούς πληθυσμούς.....	59
3.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ.....	60
3.3.1. <u>Εισαγωγή</u>	60
3.3.2. <u>Πειραματικές μολύνσεις με ιούς τύπου Reovirus</u>	60
3.3.2.1. Μόλυνση <i>per os</i>	60
3.3.2.2. Μόλυνση με έγχυση.....	65
3.3.2.3. Αποτελέσματα.....	65
3.3.3. <u>Πειραματικές μολύνσεις με άλλους εντομοπαθογόνους ιούς</u>	66
3.3.3.1. Υλικά και μέθοδοι.....	66
3.3.3.2. Αποτελέσματα.....	68
3.3.4. Συμπεράσματα.....	68
3.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΩΝ ΙΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΗ Η ΤΕΧΝΗΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ.....	74
3.4.1. <u>Εισαγωγή</u>	74
3.4.2. <u>Υλικά και μέθοδοι</u>	74
3.4.3. <u>Αποτελέσματα</u>	74
3.4.3.1. Μελέτη της υπερμικροσκοπικής δομής της παθογένεσης του Reovirus.....	74
3.4.3.2. Μελέτη της υπερμικροσκοπικής δομής της παθογένεσης του Iridovirus.....	75
3.4.3.3. Μελέτη της υπερμικροσκοπικής δομής της παθογένεσης του ιού CrPV.....	76
3.5. ΔΟΜΗ, ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ REOVIRUS..	103
3.5.1. <u>Εισαγωγή</u>	103
3.5.2. <u>Καθαρισμός του ιού</u>	103
3.5.3. <u>Δομή του βίριον</u>	105
3.5.4. <u>Φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες φως</u>	106
3.5.5. <u>Πυκνότητα ισορροπίας</u>	106
3.5.6. <u>Βιοχημική ανάλυση των καθαρών βίριον</u>	117
3.5.6.1. Φύση του νουκλεϊνικού οξέος.....	117

3.5.6.2. Ηλεκτροφορητική ανάλυση του γονιδιώματος.....117

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....123

ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ.....127

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΔΙΠΤΕΡΩΝ.....129

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....151

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αντικείμενο της διατριβής αυτής αναφέρεται στις ιώσεις του δάκου της ελιάς [*Dacus (Bactrocera) oleae* (GMELIN)]. Τα κύρια σημεία στα οποία συνεισφέρει η εργασία αυτή είναι η για πρώτη φορά διαπίστωση της ύπαρξης ιών σε φυσικούς πληθυσμούς του δάκου, η απομόνωση και μελέτη των βιοφυσικών και βιοχημικών ιδιοτήτων ενός από αυτούς του ιούς τύπου Reovirus, και η μελέτη της ευαισθησίας του δάκου σε παθογόνους ιούς. Επίσης ένα σημαντικό στοιχείο της εργασίας είναι η μελέτη των ποικίλων φαινομένων που παρουσιάζονται σε διάφορα επίπεδα της σχέσης "έντομο - ιοί".

Για τη μελέτη των ιώσεων του δάκου της ελιάς έγιναν απομονώσεις ιών από φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου και εφαρμόστηκαν μέθοδοι πειραματικής παθολογίας με τεχνητές μολύνσεις. Για τη διάγνωση χρησιμοποιήθηκαν κυτταρολογικές, βιοφυσικές, βιοχημικές και άλλες τεχνικές.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας, εμβολιάστηκαν ενήλικα δάκου που προέρχονταν από φυσικό πληθυσμό της περιοχής Καρύστου Ευβοίας, με γνωστούς ιούς. Από παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο λειοτριβημένου πολτού των παραπάνω εντόμων, διαπιστώθηκε ότι εκτός από τους γνωστούς ιούς υπήρχαν και ιοί διαμέτρου 60 nm του τύπου Reovirus. Οι ιοί αυτοί απομονώθηκαν και εμβολιάστηκαν σε υγιείς δάκους που προέρχονταν από την περιοχή Μαραθώνα. Τα έντομα του πειράματος εμφάνισαν αυξημένη θνησιμότητα σε σχέση με εκείνα του μάρτυρα όπου αντί του ιού χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός εντόμων (Ringer).

Στα πλαίσια του πειράματος οι ιοί αυτοί αναζητήθηκαν σε πληθυσμούς διαφόρων βιοτόπων. Από 22 βιότοπους που έγινε δειγματοληψία σε 8 ευρέθηκαν να υπάρχουν σωματίδια τύπου Reovirus. Παράλληλα διαπιστώθηκαν και άλλοι δύο τύποι ιών μορφολογικά διαφορετικοί. Ο ένας είχε διάμετρο 40nm ενώ ο άλλος είχε μέγεθος 30nm και έμοιαζε με Picornavirus. Οι ιοί αυτοί άλλοτε βρίσκονταν μόνοι και άλλοτε συνυπήρχαν.

Για να διαπιστωθεί η μολυσματική ικανότητα των ιών τύπου Reovirus έγιναν πειραματικές μολύνσεις δάκων, *per os* και με έγχυση. Η εκατοστιαία συνολική θνησιμότητα σε 16 ημέρες έφθασε στο 93% για τις μολύνσεις *per os*, στο 97% για τις μολύνσεις με έγχυση, ενώ ο μάρτυρας δεν ξεπέρασε το 20% και στις δύο περιπτώσεις.

Πειραματικές μολύνσεις επίσης έγιναν με 8 γνωστούς εντομοπαθογόνους ιούς στους οποίους εμφανίζουν παθογένεια τα έντομα με τη μέθοδο της έγχυσης. Από τους ιούς αυτούς ο ιός CrPV (Picornavirus) θανατώνει του δάκους σε 3 ημέρες, ο ιός CIV (Iridovirus) σε 6 ημέρες ενώ για το Densovirus του *Junonia*

coenia και το Reovirus I του *Ceratitis capitata* παρατηρήθηκε θνησιμότητα σε σχέση με το μάρτυρα που όμως ήταν βραδύτερη των 2 προηγούμενων.

Με παρατήρηση υπερμικροσκοπικών τομών ιστών του δάκου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μελετήθηκε η παθογένεση τριών τύπων ιών. Στους τύπους Reovirus διαπιστώθηκε ότι η ιοπλασμική αναπαραγωγή γίνεται στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου. Τα βίριον συγκεντρώνονται σε προεξέχοντα σημεία του εντέρου από όπου αποκόπτονται και πέφτουν στο εσωτερικό του. Στους Iridovirus (CIV) η μόλυνση παρουσιάζεται διάχυτη σε πολλούς ιστούς όπου σχηματίζονται σωροί. Όταν η μόλυνση επεκταθεί, δημιουργείται κυανή ιριδόχρωση στους δάκους. Στον Picornavirus (CrPV) ως θέση αναπαραγωγής παρατηρούνται πολλοί τύποι κυττάρων ενώ η μόλυνση συνοδεύεται από κυττοπλασμικές αλλοιώσεις.

Για τη μελέτη της δομής των βιοφυσικών και βιοχημικών ιδιοτήτων των ιών τύπου Reovirus, έγιναν καθαρισμοί με την τεχνική των φυγοκεντρήσεων και καταρτίσθηκε μέθοδος για τη διαδικασία αυτή.

Με την εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του καθαρού διαλύματος ιών μελετήθηκε η δομή των βίριον. Το σχήμα τους φαίνεται παρασφαιρικό εικοσαεδρικό, ενώ εσωτερικά διακρίνεται ένας κεντρικός πυρήνας (core) που περιβάλλεται από μία εξωτερική στρώση που αποτελείται από υποενότητες πάχους 10nm.

Οι χρωματομετρικές αντιδράσεις έδειξαν ότι πρόκειται για ιολογικό γονιδίωμα ριβοζονουκλεϊνικής φύσης με φάσμα απορρόφησης μεταξύ 260-248nm και φαινομενική πυκνότητα ισορροπίας 1,38 για τα πλήρη σωματίδια. Κατά την ηλεκτροφόρηση των ιών σε πήγμα πολυακρυλαμίδης αναγνωρίστηκαν οκτώ ζώνες μοριακού βάρους μεταξύ 2,49 και $0,45 \times 10^6$ daltons.

Η δομή, οι βιοφυσικές και βιοχημικές ιδιότητες επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό και κατάταξη των ιών αυτών στους Reovirus καθώς και τη διάκρισή τους από συγγενείς γνωστούς ιούς άλλων εντόμων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν στοιχείο της παθολογίας του δάκου, αναφορά σε παθογόνους ιούς που απομονώθηκαν από το έντομο και δίνουν ώθηση σε ένα πεδίο ερευνητικής μελέτης των σχέσεων παθογόνων ιών και δάκου.

SUMMARY

The subject of the studies reported in the present thesis is the viral infections of the olive fruit fly [*Dacus (Bactrocera) oleae* (GMELIN)]. The contributions of the thesis are: The experimental evidence of the existence of viruses in natural populations of the insect; the isolation along with the study of the biophysical and biochemical attributes of one virus which was classified in the Reovirus group and the study of the susceptibility of the insect to viral infections. Another important element of the thesis is the study of the miscellaneous phenomena that occurred in various levels of the insect-virus relationship.

For the study of the viral infections of the insect, isolations of viruses from natural populations employing various methods of experimental pathology and artificial infections were used. Also for the diagnoses of viruses, cytological, biophysical, biochemical and other techniques were employed.

Using Transmission Electron Microscopy (T.E.M.), homogenates from insects collected from the area of Karystos, Evia, inoculated with known viruses, showed that the insects were infected with a type of virus with particles of 60 nm diameter similar to Reovirus group. Artificial infections of virus free flies, collected from the Marathon area, by inoculation, using purified suspensions of the Reovirus type, caused mortality in reference to the control flies inoculated with Ringer solution.

These virus particles were investigated in insect populations of various areas in Greece. Insects of 8 from 22 areas showed virus particles of the Reovirus group.

Furthermore the same T.E.M. examination showed two other types of virus particles morphologically different from the first one. One of 40 nm diameter and another of 30 nm diameter similar to Picornavirus group. These two types of virus particles in some instances were alone and in some other instances coexisting.

Laboratory infections of virus-free flies both *per os* and by injection, using suspensions of the Reovirus group particles proved that the olive fruit fly is sensitive to them. In the case of experimental infections *per os* 97% mortality occurred within 16 days, while in the control 20% mortality was recorded in both cases.

Artificial inoculations by injection using 8 other entomopathogenic viruses showed that the CrPV (Picornavirus) killed the flies within 3 days, the CIV (Iridovirus) within 7 days, while the Densovirus of *Junonia coenia* and Reovirus I of *Ceratitis capitata* induced a lower mortality compared to the previous two.

Examination of ultrathin sections of olive fruit fly tissues was made to study the pathogenicity of the three types of viruses. The virus particles of the Reovirus type showed an intense multiplication in the midgut epithelial cells. The virions migrate to the microvilli and are released in the gut lumen. In the case of Iridovirus (CIV) group infection occurs in many tissues where viral masses are accumulated within the cells. When the infection is extensive common iridescent colour appears in the flies. In the case of Picornavirus (CrPV) group many types of cells are used for virus multiplication, while infection is followed by cytoplasmic changes.

For the biophysical and biochemical attributes of the virus particles a modified purification method has been designed for this procedure.

Purified suspension of virus particles after T.E.M. examination showed that the virion shape is a parasphaerical icosaedral, consisting of a central core with projections surrounded by a shell with tiny spikes.

The chromatometric reactions showed that the genome is RNA with an absorption spectrum between 260-248 nm and an apparent balance density of 1,38 for the complete viral particles. From the electrophoresis of the viral particles in polyacrylamide gel 8 bands of molecular weight between 2,49 and $0,45 \times 10^{-6}$ Daltons have been recognized.

Structural, biophysical and biochemical attributes allow us to classify this virus to the Reovirus group and to distinguish them from other related viruses already known from other insects.

The results of the present thesis are referring to the pathology of the olive fruit fly and to the entomopathogenic viruses isolated from the insect. Finally an opening to a research field which includes the relations between entomopathogenic viruses and the insect has been established.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική ισορροπία των πληθυσμών των εντόμων εχθρών των καλλιεργειών. Οι έρευνες που είχαν ως αντικείμενο την αποσαφήνιση του ρόλου των βιοτικών παραγόντων, οι οποίοι ενδεχομένως ελέγχουν τους φυσικούς πληθυσμούς, εγνώρισαν μία σημαντική πρόοδο με προοπτική να βρεθούν λύσεις που να αντικαθιστούν τις καθαρά χημικές καταπολεμήσεις.

Η ιδέα μιας "συνδυασμένης καταπολέμησης" άρχισε να κατακτά έδαφος στα χρόνια της δεκαετίας του '60. Στο συνέδριο του FAO στη Ρώμη (1965) που είχε ως θέμα το "Intergated Pest Control" οι ανακοινώσεις που έγιναν και κυρίως των SMITH and REYNOLDS (1967) και του van den BOSCH (1967), έδιναν μεγάλη έμφαση στις μεθόδους συνδυασμένης καταπολέμησης. Εκτοτε νέες περιβαλλοντικές θεωρήσεις δίνονται στη συνετή χρήση διαφόρων μεθόδων για την "ολοκληρωμένη αντιμετώπιση" των εχθρών των καλλιεργειών.

Με τον όρο "ολοκληρωμένη αντιμετώπιση" εννοείται ένα σύστημα διαχείρισης των εχθρών των καλλιεργειών, που λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση του περιβάλλοντος και τη δυναμική του πληθυσμού των εχθρών, χρησιμοποιεί όλες τις κατάλληλες τεχνικές και μεθόδους με ένα όσο το δυνατόν αρμονικό τρόπο και επιτυγχάνει να διατηρεί τον εχθρό πληθυσμό σε επίπεδο κάτω από αυτό που προκαλεί οικονομική ζημιά. Περιλαμβάνει συνδυασμό μέσων, όπως βιολογικό έλεγχο με φυσικούς εχθρούς, καλλιεργητικές μεθόδους, χρησιμοποίηση ανθεκτικών φυτών ξενιστών, μηχανική προστασία και χημική εκλεκτική καταπολέμηση, ώστε να συνεισφέρουν σε ένα ασφαλές, αποτελεσματικό, μόνιμο και οικονομικά αποδεκτό σύστημα προστασίας των καλλιεργειών.

Στα πλαίσια του βιολογικού ελέγχου στην ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των εχθρών των καλλιεργειών, εκτός από τους φυσικούς εχθρούς (παράσιτα και αρπακτικά) η έρευνα αποσκοπεί στο να εντοπίσει μολυσματικές ασθένειες, οι οποίες υπεισέρχονται ως ουσιαστικοί παράγοντες δημιουργώντας προβλήματα στην ισορροπημένη πορεία των εντομολογικών πληθυσμών και στη δυναμική τους. Η απομόνωση παθογόνων μικροοργανισμών από τους ίδιους τους εχθρούς των καλλιεργειών, συνέβαλε στην ανάπτυξη ενός νέου κλάδου της Εντομολογίας εκείνου της Παθολογίας και Μικροβιολογικής Καταπολέμησης των Εντόμων. Έτσι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μαζί με ωφέλιμα έντομα που θεωρούνται μέσα φυτοπροστασίας φιλικά στο περιβάλλον γίνονται αντικείμενο πολλών μελετών.

Το δίπτερο δάκος της ελιάς, [*Dacus (Bactrocera) oleae* (Gmelin)], Οικογ. Tephritidae, θεωρείται ο σημαντικότερος εχθρός της ελαιοκαλλιέργειας και παρά την ανάπτυξη πολλών μεθόδων για την αντιμετώπισή του, αρκετές πλευρές (οικονομικές, περιβαλλοντικές) επιδέχονται βελτίωση που απαιτούν έρευνα.

Η ερευνητική αυτή εργασία ξεκίνησε με προοπτική τη μελέτη των ασθενειών που προκαλούν στο δάκο παθογόνοι ιοί, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη νέων μέσων καταπολέμησής του στα πλαίσια μιας ολοκληρωμένης αντιμετώπισης του προβλήματος.

Η ζημιά που προκαλεί το έντομο στον ελαιόκαρπο είναι τέτοια που το κατατάσσει ως το σπουδαιότερο εχθρό της ελιάς στην Ελλάδα και σε ολόκληρη τη λεκάνη της Μεσογείου και οι απώλειες που δημιουργούνται στην ελαιοκομική παραγωγή είναι σημαντικές. Έτσι, ενώ η καταπολέμηση με χημικά, βιοτεχνολογικά ή άλλα μέσα έγιναν αντικείμενο πολυαριθμών εργασιών, πρακτικά καμία έρευνα δεν είχε αναληφθεί όσο αφορά στην παθολογία αυτού του εχθρού.

Αναφάνηκε λοιπόν, ότι θα ήταν ενδιαφέρον και χρήσιμο να μελετηθεί από την μία πλευρά κατά πόσο το έντομο αυτό είναι ευαίσθητο σε διάφορες φυλές ιών, που ήταν ήδη γνωστές για την παθογένεια τους σε άλλα είδη εντόμων οικονομικής σημασίας και επίσης να ερευνηθεί η τυχόν παρουσία ιών στους φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου που να υπεισέρχονται στη ρύθμιση της πορείας των πληθυσμών του.

Μετά από μία σύντομη ανασκόπηση στο ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ που τοποθετεί το πρόβλημα του δάκου στην ελαιοκαλλιέργεια και κάνοντας λόγο για τις ελάχιστες βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν την παθολογία του, παρουσιάζονται οι κυριώτεροι τύποι ιώσεων που έχουν απομονωθεί στα ασπόνδυλα καθώς και οι ιοί που έχουν καταταγεί στην οικογένεια των Reoviridae. Μία μελέτη των κυριότερων ιώσεων που εμφανίζονται στα Δίπτερα έχει προσαρτηθεί στο τέλος της παρούσας διατριβής ως ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.

Ακολουθεί η περιγραφή της γενικής μεθοδολογίας σε ένα ξεχωριστό κεφάλαιο με τίτλο ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των ερευνών.

Στο ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ αναπτύσσεται η εργασία που αφορά στην ανακάλυψη 3 τύπων ιών σε φυσικούς πληθυσμούς και στη μελέτη της γεωγραφικής διασποράς τους στην ηπειρωτική και νησιωτική Ελλάδα. Επίσης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραματικών μολύνσεων με άλλους εντομοπαθογόνους ιούς. Αναφέρεται ακόμη η μελέτη της υπερμικροσκοπικής δομής της φυσικής ιολογικής μολυσματικότητας από Reovirus και από δύο πειραματικές μολύνσεις μία από Iridovirus και η άλλη από Picornavirus. Η δομή, οι βιολογικές και βιοχημικές ιδιότητες του Reovirus που απομονώθηκε από το *D. oleae* αποτελούν το αντικείμενο του

τελευταίου τμήματος του ειδικού μέρους.

Τέλος ακολουθεί η συζήτηση των αποτελεσμάτων και τα συμπεράσματα σε σχέση με τα αναμενόμενα οφέλη από την έρευνα.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

1.1. Εισαγωγή

Ο δάκος της ελιάς, είναι ένας από τους σημαντικότερους εχθρούς της ελαιοκομικής παραγωγής της χώρας μας. Η εκτεταμένη καλλιέργεια της ελιάς με αριθμό άνω των 120.000.000 δένδρων κατά τα στοιχεία της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας, κάνει επιτακτική την ανάγκη της αντιμετώπισης του εχθρού αυτού. Έτσι, οι ερευνητές εργάζονται από χρόνια μελετώντας εντατικά το δάκο και τις διάφορες πλευρές προβλημάτων που δημιουργούνται. Μία από αυτές τις πλευρές είναι και η σχέση του εντόμου με παθογόνους ιούς που πραγματεύεται η εργασία αυτή.

Στο πρώτο τμήμα του γενικού μέρους θα γίνει αναφορά στο έντομο και τους διάφορους εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες που το επηρεάζουν. Θα αναφερθεί πρώτα το οικονομικό ενδιαφέρον για τη χώρα μας -της καλλιέργειας της ελιάς- που είναι ο ξενιστής του εντόμου, κατόπιν η φυτοφάγος πανίδα των αρθροπόδων που συναντώνται στους ελαιώνες, ακολούθως ο δάκος ως προς τους εντομολογικούς του χαρακτήρες και τέλος οι μικροοργανισμοί που έχουν σχέση με το έντομο είτε ως συμβιωτικά είτε ως παθογόνα.

1.1.1. Το οικονομικό ενδιαφέρον της ελαιοκαλλιέργειας για την Ελλάδα

Στη χώρα μας καθώς και στις άλλες χώρες της λεκάνης της Μεσογείου η ελαιοκαλλιέργεια έχει γίνει πράξη από την αρχαιότητα. Στην Ελλάδα χρονολογείται από την προμινωϊκή εποχή. Συνδεδεμένη πάντοτε με τους μύθους, τους ιερούς συμβολισμούς των θρησκειών, την εγκατάσταση των αποικιών και το εμπόριο, αποτέλεσε οικονομική βάση για τη στήριξη του ελληνικού πολιτισμού.

Προσαρμοσμένο το δένδρο αυτό στις συνθήκες του μεσογειακού κλίματος και εξ αιτίας κυρίως των προϊόντων του, του λαδιού και των ελιών, που έχουν εξαιρετικά διαιτολογικές και θρεπτικές ιδιότητες, αποτελούν βασικό στοιχείο της διατροφής του πληθυσμού της Ελλάδας και την κύρια δενδροκομική καλλιέργεια της χώρας μας.

Από άποψη παγκόσμιας παραγωγής, η Ελλάδα τοποθετείται στην τρίτη θέση τόσο για την παραγωγή λαδιού όσο και για εκείνη των επιτραπέζιων ελιών (OLIVAE, 1990). Από τον αριθμό των καλλιεργουμένων δένδρων (άνω των 120.000.000) το μεγαλύτερο ποσοστό (80% περίπου) αποτελούν οι ποικιλίες για παραγωγή λαδιού, ενώ το υπόλοιπο 20% οι ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς.

Στα κοινωνικά και οικονομικά πλαίσια η σημασία της καλλιέργειας είναι μεγάλη για τους παρακάτω λόγους (ΨΥΛΛΑΚΗΣ, 1976):

-Περισσότερες από 300.000 αγροτικές οικογένειες απασχολούνται στην ελαιοκαλλιέργεια και εκατομμύρια εργατομήρες χρησιμοποιούνται.

-Μεγάλες εκτάσεις που δεν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για άλλες καλλιέργειες αξιοποιούνται.

-Δίνεται η ευκαιρία να χρησιμοποιηθούν στην καλλιέργεια αυτή κατά τη διάρκεια του χειμώνα, εργατικά χέρια, όπου οι αγροτικές εργασίες είναι πολύ λίγες.

-Εισάγεται ετήσιο συνάλλαγμα που φθάνει στα 50 εκατομμύρια δολλάρια, προερχόμενο από την εξαγωγή των γεωργικών αυτών προϊόντων.

1.1.2. Η φυτοφάγος πανίδα των αρθροπόδων στους ελαιώνες

Η φυτοφάγος πανίδα που συναντάται στους ελαιώνες είναι εξαιρετικά πλούσια, αφού η καλλιέργεια είναι πολύ παλαιά, προσαρμοσμένη στα μεσογειακά οικοσυστήματα και δεν υφίσταται έντονες καλλιεργητικές επεμβάσεις. Μερικές καταγραφές ομιλούν για περισσότερα από 50 είδη εντόμων. Ο ΠΕΛΕΚΑΣΗΣ (1962) αναφέρει 38 και ο ARAMBOURG (1986) 34 είδη ως τα πιο συχνά απαντώμενα στη Μεσόγειο, που η παρουσία τους μπορεί να αποτελέσει κάποιο δυναμικό ή οικονομικό κίνδυνο.

Τα κυριότερα από τα είδη αυτά αναφέρονται στον παρακάτω κατάλογο (ARAMBOURG, 1986), και είναι προσαρμοσμένος στη συνηθέστερη ταξινόμηση, που ξεκινά από έντομα ανώτερα για να καταλήξει στις κατώτερες τάξεις. Τέλος γίνεται αναφορά μόνο των οικογενειών των ακάρεων, που συναντώνται στους ελαιώνες.

Κλάση INSECTA

Τάξη Coleoptera Curculionidae

Otiorrhynchus cribricollis. (Gyll.)
Rhynchites cribripennis (Desbr.)
Scolytidae
Hylesinus oleiperda F.
Phloeotribus scarabeoides Bern.

Tάξη Lepidoptera

Cossidae
Zeuzera pyrina L.
Cossus cossus L.
Hyponomeutidae
Prays oleae Bern.
Zelleria oleastrella Mill.
Gracillariidae
Parectopa latifoliella Mill.
Pyralidae
Palpita (Margaronia) unionalis Hubn.
Euzophera pinguis Haw.
Geometridae
Gymnoscelis pumilata Hubn.

Tάξη Diptera

Cecidomyiidae
Dasineura oleae F. Loew
Ressaliella oleisuga Targioni-Tozzetti
Prolasioptera berlesiana Paoli
Asynapta furcifer Barnes
Tephritidae
Bactrocera (Dacus) oleae (Gmelin)

Tάξη Homoptera

Psyllidae
Euphyllura olivina Costa
Coccidae
Saissetia oleae Olivier
Philippia follicularis Targioni-Tozzetti
Lichtensia viburni Signoret
Asterolecaniidae
Pollinia pollini Costa
Diaspididae
Aspidiotus nerii Bouche
Chrysomphalus dictyospermi Morg.
Aonidiella aurantii Mask.
Quadraspidotus ostreaeformis Curtis
Quadraspidotus lenticularis Lind.
Quadraspidotus maleti Vayss.

Leucaspis riccae Targ.
Parlatoria oleae Colvee
Lepidosaphes ulmi L.
Lepidosaphes destefanii Leon.

Epidiaspis leperii Sign.

Getulaspis bupleuri Marchal

Τάξη Thysanoptera

Phloeothripidae

Liothrips oleae (Costa)

Κλάση ARACHNIDA

Τάξη Acarina

Οικογ. Eriophyidae

" Tenuipalpidae

" Tetranychidae

" Phytoseiidae

Υπόλοιπα ακάρεα

1.1.3. *Dacus (Bactrocera) oleae* (Gmelin)

1.1.3.1. Συστηματική κατάταξη

Ο δάκος της ελιάς γνωστός μέχρι πρόσφατα με το επιστημονικό όνομα *Dacus oleae* (Gmelin), με μία νέα ταξινόμηση μετονομάστηκε σε *Bactrocera oleae* (DREW, 1989). Είναι έντομο που ανήκει στην τάξη: Diptera, Υπόταξη: Cyclorrhapha, Οικογένεια: Tephritidae, Υποοικογένεια: Dacinae που περιλαμβάνει 290 είδη τα οποία κατατάσσονται σε 2 γένη το *Bactrocera* και το *Dacus*.

Η μετονομασία του *Dacus oleae* σε *Bactrocera oleae*, έχει γίνει αποδεκτή από το *Review of Agricultural Entomology* από Vol 78, 1991, ενώ δεν έχει γίνει γνωστό ακόμη σε άλλα περιοδικά.

1.1.3.2. Γεωγραφική κατανομή

Ο δάκος είναι είδος προσαρμοσμένο στην καλλιεργούμενη ελιά. Εν τούτοις απαντάται σε όλα τα είδη φυτών του γένους *Olea*, ιδιαίτερα στην Αφρική. Το έντομο απαντάται σε όλες τις χώρες που βρίσκονται παρά την Μεσόγειο θάλασσα, στα Κανάρια Νησιά, φθάνει μέχρι την Ινδία και ανευρίσκεται σχεδόν σε όλη την Αφρική.

1.1.3.3. Μορφολογική περιγραφή

Το έντομο γνωστό από την αρχαιότητα, περιγράφηκε από το

GMELIN (1788). Μία λεπτομερής περιγραφή έχει γίνει από το SEGUY (1934).

-Το ακμαίο είναι ένα δίπτερο μήκους 3-4 χιλ. περίπου, χρώματος κιτρίνου προς το ερυθρωπό. Η κεφαλή είναι κίτρινη με δύο μαύρα στίγματα κάτω από τις κεραίες. Ο θώρακας είναι κιτρινέρυθρος, με 4 φαιόχρες γραμμώσεις στην ραχιαία πλευρά. Η κοιλία έχει κηλίδες με μαύρα στίγματα που άλλοτε είναι έντονα και άλλοτε δεν υπάρχουν, οι πτέρυγες είναι υαλώδεις, ελαφρά ιριδίζουσες με μία μικρή κηλίδα που διαχέεται μέχρι το άκρο της πτέρυγας (apex).

-Το ωό είναι επίμηκες, κυλινδρικό, λευκό, λοβοειδές στη μικροπύλη σε σχέση με την οπίσθια πλευρά με μήκος 0,7mm και διάμετρο 0,2mm.

-Η προνύμφη είναι σκωληκόμορφη και έχει κατά το τέλος της ανάπτυξης της μήκος 6 έως 8 χιλιοστά. Κατά την ανάπτυξή της περνά από τρία διαδοχικά στάδια που το καθένα χαρακτηρίζεται από τον αριθμό και το σχήμα των αναπνευστικών στιγμάτων, όπως έχει περιγραφεί από τον TURINETTI (1922). Ζεί μέσα στη σάρκα του καρπού την οποία κατατρώγει. Νυμφώνεται είτε μέσα στον καρπό μεταξύ του πυρήνα και της επιδερμίδας προς την έξοδο της στοάς είτε στο έδαφος, αφού αφήσει την ελιά από μία ευδιάκριτη οπή εξόδου.

-Η νύμφη είναι σχήματος ελλειπτικού, χρώματος κιτρίνου ανοικτού μέχρι καστανού και έχει μήκος 4-4,5 χιλ.

1.1.3.4. Βιολογικός κύκλος

Η διαχείμαση γενικά λαμβάνει χώρα στο στάδιο της νύμφης στο έδαφος αλλά απαντάται ακόμη να διαχειμάζει ως ακμαίο μέσα στα δένδρα, ή σε κατάσταση ωού ή προνύμφης σε καρπούς που παρέμειναν επάνω στα δένδρα. Η ωοτοκία αρχίζει κατά τον Ιούνιο, περίοδο όπου εμφανίζονται οι νέες ελιές. Μετά την εκκόλαψη η προνύμφη ορύσσει μία στοά στο μεσοκάρπιο και πλησιάζει προς τον πυρήνα, αυξάνοντας τον όγκο της βαθμηδόν, σύμφωνα με την ανάπτυξή της. Στους 25°C, ο προνυμφικός κύκλος διαρκεί 10-12 ημέρες περίπου. Η προνύμφη συνήθως νυμφώνεται μέσα στην ελιά, στο άκρο της στοάς κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Μετά τις αρχές του Σεπτεμβρίου αφήνει τον καρπό για να νυμφωθεί μέσα στο έδαφος. Το καλοκαίρι η νύμφωση διαρκεί 10 ημέρες και όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, μία γενεά εξελίσσεται σε ένα μήνα, συμπεριλαμβανομένης της περιόδου πρωτοκίας. Ανάλογα με τις περιοχές είναι δυνατή η συμπλήρωση 2-4 γενεών κατά τη διάρκεια των μηνών που οι κλιματολογικές συνθήκες είναι ευνοϊκές. Ο αριθμός των ετησίων γενεών δεν είναι κοινός σε όλες τις περιοχές, και εξαρτάται από τη

θερμοκρασία, το γεωγραφικό πλάτος των περιοχών και από τις τοπικές κλιματοαγρονομικές συνθήκες.

1.1.3.5. Παρασιτισμός

Η μεσογειακή παρασιτική πανίδα του δάκου περιορίζεται σε 5 είδη, 4 εκτοφάγα (εκτοπαράσιτα) της υπερικογένειας Chalcidoidea και 1 ενδοφάγο (ενδοπαράσιτο) της οικογένειας Braconidae (ARAMBOURG, 1986).

Τα εκτοπαράσιτα Chalcidoidea που είναι τα *Eupelmus urozonus* Dalm., *Phygadeuonidae* Fer. et Del., *Eurytoma martelli* Dom. και *Cyrtoptyx dacicida* Silv. γεννούν τα ωά τους στον ελαιόκαρπο, δίπλα στην προνύμφη. Το ενδοφάγο παράσιτο (ενδοπαράσιτο) *Opius concolor* Szepi (Braconidae) γεννά τα ωά του μέσα στην προνύμφη του 3ου σταδίου.

Γενικά, το σύμπλεγμα των πληθυσμών των παρασίτων παραμένει σε επίπεδα που δεν μπορούν πάντοτε να εξασφαλίσουν ένα ικανοποιητικό έλεγχο του δάκου σε φυσικές συνθήκες. Η δραστηριότητα τους είναι αξιοσημείωτη κατά τη θερινή περίοδο, ενώ κατά το φθινόπωρο μειώνεται, τότε που ο δάκος της ελιάς γίνεται πιο επικίνδυνος. (ARAMBOURG, 1986).

1.1.3.6. Καταπολέμηση

Για την καταπολέμηση του δάκου στη χώρα μας εφαρμόζονται μέχρι σήμερα δύο μέθοδοι χημικών επεμβάσεων. Η μία είναι η κατασταλτική και γίνεται εναντίον των προνυμφών που βρίσκονται στους καρπούς και απαιτεί χρησιμοποίηση εντομοκτόνων διασυστηματικής δράσης όπως το fenthion ή το demethoate. Οι ψεκασμοί αυτού τύπου καλύψεως ("cover-spray") σταματούν τις προσβολές με επικίνδυνες όμως παρενέργειες, στην ωφέλιμη πανίδα. Οι ψεκασμοί καλύψεως εφαρμόζονται συνήθως σε περιοχές της Β. Πελοποννήσου, στην Κέρκυρα και σε άλλες περιοχές όπου επικρατούν ειδικές συνθήκες καλλιέργειας όπως σε ελαιώνες που είναι απομονωμένοι, συγκαλλιεργούμενοι, ευρισκόμενοι μέσα σε αστικές ζώνες, σε ανεμόπληκτες περιοχές, σε οικισμούς που συγκεντρώνουν βρόχινο νερό σε στέρνες, κοντά σε λίμνες, ποτάμια, αύλακες που υδροδοτούν κατοικημένες περιοχές, καθώς και σε άλλες περιπτώσεις που απαιτούν αυτή τη μέθοδο καταπολέμησης.

Η δεύτερη μέθοδος, η προληπτική, αφορά στη μείωση των πληθυσμών του ακμαίου και βασίζεται στην αρχή του τοπικού δολωματικού ψεκασμού ("bait spray"). Στις εφαρμογές αυτών των

ψεκασμών από εδάφους, χρησιμοποιείται ως δόλωμα μία υδρολυμένη πρωτεΐνη στην οποία προστίθεται ένα κλασσικό οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο. Στις "από αέρος" εφαρμογές χρησιμοποιείται υδρολυμένη πρωτεΐνη στην οποία προστίθεται το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο σε χαμηλή δόση.

Η εφαρμογή των μεθόδων αυτών βασίζεται στην παρακολούθηση των πληθυσμών του εντόμου, με δειγματοληψίες καρπών και με συλλήψεις σε τροφικές παγίδες τύπου: Mc Phail. Εντομοπαγίδες με ελκυστικό οσμής, όπως το φωσφορικό διαμμώνιο ή τη θειϊκή αμμωνία ή υδρολυμένες πρωτεΐνες, αποτελούν τα συνηθισμένα μέσα παγιδεύσεως. Ακόμη παγίδες χρώματος όπως το φθορίζον κίτρινο και παγίδες με φερομόνη έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειράματα μεγάλης εκτάσεως.

Τέλος πολυάριθμες μελέτες έχουν αναληφθεί από διάφορους ερευνητές που δοκιμάζουν να θέσουν σε εφαρμογή και άλλες μεθόδους επέμβασης. Είναι αυτές που αφορούν στην ανάπτυξη βιοτεχνολογικών και βιολογικών μεθόδων καταπολεμήσεως εναντίον του δάκου. Πολλές ακόμη εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί επάνω στο θέμα του συμπλέγματος των παρασίτων στο δάκο της ελιάς (DELUCCHI, 1957, FERRIERE et DELUCCHI, 1957, ISAAKIDES 1957, DELANOUE et ARAMBOURG, 1965, 1967, 1969) και στις πρώτες εξαπολύσεις του ενδοπαρασίτου *O. concolor* SzepI. από STAVRAKI (1967), MONASTERO (1968), και LIAROPOULOS et al (1977).

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '60 έγινε προσπάθεια ανάπτυξης και εφαρμογής στη χώρα μας της μεθόδου εξαπόλυσης στείρων εντόμων από επιστήμονες του ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος". Τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά διότι τα στείρα έντομα που εξαπολύονταν στους ελαιώνες και προέρχονταν από τεχνητή εκτροφή στα εντομοτροφεία δεν είχαν την δυνατότητα να ανταγωνιστούν εκείνα που εκτρέφονταν σε ελαιόκαρπο. (PROKOPY et al., 1975, REMUND et al., 1977).

Σήμερα, μεταξύ των προοπτικών που υπάρχουν είναι η εφαρμογή βιοτεχνολογικών μεθόδων, όπως η χρήση ελκυστικών παγίδων με ενσωμάτωση φερομόνης φύλου και τροφικού ελκυστικού (HANIOTAKIS et al. 1986, 1987, 1987 (a)). Βελτίωση της μεθόδου έγινε με τη χρήση ξυλίνων παγίδων εμποτισμένων με το εντομοκτόνο deltamethrine και χρήση ελκυστικών ουσιών τροφής και φύλου (BROUMAS, 1986, 1987, 1990).

1.1.4. Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με το δάκο της ελιάς

Οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με το δάκο είναι : οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί που έχουν πρατηρηθεί και μελετηθεί από αρκετά χρόνια και οι παθογόνοι για τους οποίους ελάχιστες εργασίες έχουν γίνει μέχρι σήμερα.

1.1.4.1. Συμβιωτικά βακτήρια

Η παρουσία συμβιωτικών βακτηρίων στο *D. oleae* είναι γνωστή από τις εργασίες του PETRI (1910) ο οποίος και περιγράφει τα βακτήρια που βρίσκονται στη διαφοροποιημένη διεύρυνση του οισοφάγου στην κεφαλή του εντόμου (κεφαλική κύστη), στις αναδιπλώσεις της βάσης του ωθέτη του θήλεος καθώς και μέσα στους 4 γαστρικούς σάκκους (ή γαστρικές θηλές - caeca) στην πρόσθια άκρη του μεσεντέρου της προνύμφης. Οι αναδιπλώσεις αυτές (ή γαστρικές θηλές) είναι κενές από βακτήρια στις προνύμφες του τελευταίου σταδίου. Από τη διαφοροποιημένη κοιλότητα κεφαλής του ακμαίου τα συμβιωτικά βακτήρια διαχέονται μέσα σε ολόκληρο το έντερο και τις αναδιπλώσεις του τελευταίου τμήματος μέχρι την έδρα. Ακόμη τα βακτήρια αυτά ανευρίσκονται στον ωθέτη του θήλεος όπου και γίνεται η μόλυνση των ωών. Έτσι εξασφαλίζεται η συνεχής παρουσία του βακτηρίου από τη μία γενεά στην άλλη.

Ο PETRI (1909) θεώρησε ότι τα βακτήρια αυτά ανήκουν στο *Pseudomonas savastanoi*, το αίτιο των καρκινωμάτων (ή φυματώσεως) της ελιάς. Το 1966 ο HAGEN απέδειξε ότι η παρουσία αυτών των βακτηρίων είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της κανονικής ανάπτυξης των προνυμφών μέσα στους καρπούς με τα πρωτεολυτικά ένζυμα που συντελούν στη διάσπαση των πρωτεϊνών του καρπού καθώς και την επιπλέον σύνθεση απαραίτητων αμινοξέων που δεν υπάρχουν στην ελιά.

Οι FYTIZAS and TZANAKAKIS (1966) και οι TZANAKAKIS and STAVRINIDES (1973) επιβεβαίωσαν τη σπουδαιότητα των συμβιωτικών μικροοργανισμών για την ανάπτυξη του *D. oleae*. Όπως ο HAGEN (1963) έτσι και αυτοί οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν την streptomycine στην τεχνητή εκτροφή του δάκου για να αποφύγουν επιμολύνσεις της τροφής από μικροοργανισμούς. Βάζοντας όμως streptomycine στην τροφή διαπίστωσαν ότι τα θήλεα άτομα που ωτοκούσαν σε ελαιόκαρπο δεν έδιναν απογόνους. Δηλαδή μετά την εκκόλαψη οι νεαρές προνύμφες μέσα στον ελαιόκαρπο δεν μπορούσαν να εξελιχθούν και έθνησκαν.

Οι YAMVRIAS et al. (1970) απέδειξαν ότι τα βακτήρια που λαμβανόνταν από τη διαφοροποιημένη κοιλότητα του οισοφάγου του δάκου είναι διαφορετικά από εκείνα του *P. savastanoi*. Ο LUTHY et al., (1983, α και β) μελέτησαν τα βακτήρια αυτά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως (scanning) και πέτυχαν να τα καλλιεργήσουν σε θρεπτικό υλικό.

Ο TSIROPOULOS (1983) προσδιόρισε πολλά είδη βακτηρίων που απομόνωσε από την εντερική μικροχλωρίδα του *D. oleae*.

Ο ΤΖΑΝΑΚΑΚΙΣ και συνεργ. (ΤΖΑΝΑΚΑΚΙΣ et al. 1975, LAMBROU et al. 1978) έκαναν έρευνες με την προοπτική να μειώσουν τους πληθυσμούς του *D. oleae* καταστρέφοντας τα συμβιωτικά βακτήρια με τη χρήση αντιβιοτικών αν και προς το παρόν η χρήση των γνωστών αντιβιοτικών στη φύση δεν είναι αποδεκτή.

1.1.4.2. Παθογόνοι μικροοργανισμοί

1.1.4.2.1. Βακτήρια

Ο HAGEN (1963) είχε αναφερθεί πρώτος σε προβλήματα της εργαστηριακής εκτροφής του δάκου από βακτήρια.

Οι HANIOTAKIS and AVTZIS (1977) συγκέντρωσαν από νεκρές προνύμφες τεχνητής εκτροφής, 12 είδη βακτηρίων. Το είδος *Pseudomonas putida* αποδείχθηκε ισχυρά παθογόνο για τα θήλεα ακμαία, ενώ η θνησιμότητα για τα άρρενα ήταν μικρότερη. Η διαφορά αυτή εμφανίζεται διότι ο βακτηριακός πολλαπλασιασμός λαμβάνει χώρα στο επίπεδο του ωσθέτη εμποδίζοντας την ωοτοκία και την εκκένωση. Πάντως στην τεχνητή τροφή όχι μόνο του δάκου, αλλά και άλλων ειδών εντόμων αναπτύσσονται συχνά μικροοργανισμοί που υπό ορισμένες συνθήκες μπορούν να αποδειχθούν παθογόνοι για το εκτρεφόμενο έντομο.

1.1.4.2.2. Μύκητες

Κατά το 1974 δοκιμάστηκε η μολυσματικότητα του εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana* (Fungi imperfecti) στα τελευταία προνυμφικά και νυμφικά στάδια του δάκου της ελιάς. Ο μύκητας αυτός είναι συχνά απαντώμενος στη φύση, ισχυρά παθογόνος και μπορεί να προσβάλλει πολυάριθμα είδη εντόμων (ΓΙΑΜΒΡΙΑΣ, Προσωπική επικοινωνία). Στο πείραμα αυτό έγινε μόλυνση του εδάφους με κονίδια του μύκητα και τοποθέτηση σε αυτό δάκου εκτροφής που βρισκόταν στο τελευταίο προνυμφικό στάδιο ή κατά την έναρξη της νύμφωσης. Επίσης εμβαπτίστηκαν έντομα του ιδίου σταδίου σε υδατικό διάλυμα του μύκητα και τοποθετήθηκαν ακάλυπτα σε τρυβλία με υγρασία. Στις δύο αυτές περιπτώσεις τα αποτελέσματα δεν θεωρήθηκαν ικανοποιητικά, όμως η ανάπτυξη του μύκητα αυτού ή άλλου είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί με διαφορετικές συνθήκες πειράματος. Οι παθογόνοι μύκητες θα μπορούσαν να γίνουν αντικείμενο ευρύτερης μελέτης, ώστε να αξιολογηθεί η μολυσματική τους ικανότητα και η δυνατότητα ελέγχου των πληθυσμών, στο εντός της γης στάδιο διαχείμασης του εντόμου.

1.1.4.2.3. Πρωτόζωα

Πολλοί μικροοργανισμοί της κατηγορίας αυτής είναι παθογόνοι στα διάφορα έντομα. Ο ORMIERES et al. (1977) χρησιμοποίησαν το πρωτόζωο της τάξης των Μικροσποριδίων *Octospora muscaedomesticae* σε δοκιμές που έγιναν με pronύμφες δάκου της ελιάς.

Το πρωτόζωο αυτό βρέθηκε τυχαία να μολύνει pronύμφες της μύγας της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*) τεχνητής εκτροφής. Το παράσιτο προσβάλλει τα κύτταρα του πεπτικού σωλήνα της pronύμφης και προκαλεί λύση του εντερικού επιθηλίου. Τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται στο δεύτερο και τρίτο στάδιο της pronύμφης.

Το ποσοστό θνησιμότητας στις δοκιμές που έγιναν στο δάκο ήταν μεγαλύτερο από 90%. Όμως η θανατηφόρα εξέλιξη από τη μόλυνση με το πρωτόζωο αυτό δεν δίνει πολλές υποσχέσεις για άμεση πρακτική εφαρμογή. Τούτο γιατί είναι πολύ δύσκολο να μολύνει κανείς τις pronύμφες στη φύση με ένα παρασκεύασμα που θα περιέχει το παράσιτο. Όμως το θέμα είναι ενδιαφέρον από την άποψη της παρουσίας παθογόνου δράσης πρωτοζώων στο δάκο της ελιάς.

1.1.4.2.4. Ιοί

Εκτός από την περιγραφή από τον MOUSSA (1978) ενός παρασφαιρικού ιού διαμέτρου 40-65 nm στο *Dacus tryoni*, κανένας άλλος ιός δεν ήταν γνωστός στο *D. oleae* όταν ξεκίνησε η ερευνητική αυτή εργασία.

Οι πρώτες επίσημες ανακοινώσεις σχετικά με την ύπαρξη ιών στο δάκο της ελιάς έγινε από τους BERGOIN, et al., (1983), ANAGNOU et al., (1984) ενώ είχαν προηγηθεί ανακοινώσεις υπό μορφή εκθεμάτων (rapport) (ANAGNOU-VERONIKI, 1980, 1981, 1983, 1984) όπου αναφέρεται η ύπαρξη δύο ιών. Στη συνέχεια οι MANOUSIS et al., (1987a, 1987b) περιέγραψαν διάφορους ιούς στο *D. oleae*.

1. 2. ΟΙ ΙΟΙ

1.2. Εισαγωγή

Στο σύμπλοκο των εκδηλουμένων ασθενειών των εμβίων όντων, ένα μέρος ευθύνης έχουν οι ιοί, που είναι νουκλεοπρωτεϊνικές, υπερμικροσκοπικές, μολυσματικές και δυνητικά νοσολογικές οντότητες που αναπαράγονται μέσα σε ζωντανά κύτταρα (ΖΑΧΟΣ και συνεργ. 1984). Η παρουσία τους σημειώθηκε από το BOLLE (1873, 1893), όπου αναφέρεται η ύπαρξή τους και ορισμένες τους ιδιότητες.

Οι ιοί, προκαλούν ασθένειες στα έμβια όντα τις λεγόμενες ιώσεις, που αποτέλεσαν αντικείμενο εκτεταμένων μελετών. Η ανάγκη χαρακτηρισμού και προσδιορισμού των ιών οδήγησε στη δημιουργία ταξινομικών συστημάτων και ονοματολογίας. Μεταξύ των χαρακτήρων που λαμβάνονται υπόψη για την ταξινόμηση είναι: η φύση του νουκλεϊνικού οξέος εάν είναι DNA ή RNA (οι ιοί περιέχουν ένα μόνο είδος, ως γνωστόν) το νουκλεϊνικό οξύ εάν είναι μονονηματικό ή διπλονηματικό, το βίριον (δηλαδή το ώριμο σωματίδιο του ιού) εάν είναι με κάλυμμα ή γυμνό, το είδος της συμμετρίας που έχει ο ιός εάν είναι κυβική, ελικοειδής ή άλλου τύπου, τα βίριον εάν είναι εγκλεισμένα ή μη εγκλεισμένα, το σχήμα των βίριον εάν είναι ωοειδές, ραβδοειδές, εικοσαεδρικό, παρασφαιρικό κ λ.π.), η αναπαραγωγή εάν είναι κυτταροπλασματική ή πυρηνική το μέγεθος των βίριων, καθώς και άλλα κριτήρια που συνεχώς προσθέτονται.

Κατά το International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV), (1979), η ταξινομική κατάταξη των ζωϊκών ιώσεων που περιλαμβάνει και τους ιούς των ασπονδύλων έχει την διάταξη που δίνεται στον πίνακα I.

1.2.1. Γενικά για τους ιούς των ασπονδύλων

Στην εξέλιξη της παθολογίας των ασπονδύλων και ειδικότερα στην ιολογία διακρίνονται δύο περίοδοι που αντιστοιχούν σε διαφορετικές τάσεις έρευνας.

Στην πρώτη περίοδο που ξεκινά το 19ο αιώνα, η ιολογία των ασπονδύλων περιορίζεται στην περιγραφή μερικών χαρακτηριστικών τύπων ιολογικών ασθενειών που εύκολα αναγνωρίζονται από την παρουσία εγκλειστικών σωματιδίων ή από την αξιοσημείωτη επιζωοτιολογική τους δράση. Πρόκειται κυριώς για πυρηνικές

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

ΠΑΡΟΥΣΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΙΩΝ

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΓΕΝΟΣ Η ΟΜΑΔΑ

DNA Viruses	}	Adenoviridae		{ Mastadenovirus Aviadenovirus		
		Baculoviridae		Baculovirus		
		Herpesviridae	{	Alphaherpesvirinae (Herpes simplex virus group) Betaherpesvirinae (Cytomegalovirus group) Gammaherpesvirinae (Lymphoproliferative virus group)		
		Iridoviridae		Iridovirus		
		Papovaviridae		{ Papillomavirus Polyomavirus		
		Parvoviridae		{ Parvovirus "Adeno-associated virus" Densovirus		
		Poxviridae	}	Chordopoxvirinae	{	Orthopoxvirus Avipoxvirus Capripoxvirus Leporipoxvirus Parapoxvirus Suipoxvirus
						Entomopoxvirinae
		RNA Viruses	}	Arenaviridae		Arenavirus
				Bunyaviridae		Bunyavirus
Coronaviridae				Coronavirus		
Orthomyxoviridae				Influenzavirus		
Paramyxoviridae				{ Paramyxovirus Morbillivirus Pneumovirus		
Picornaviridae				{ Enterovirus Rhinovirus Cardiovirus Aphthovirus		
Caliciviridae (proposed family)				Calicivirus		
Reoviridae				{ Reovirus Orbivirus Rotavirus		
Retroviridae	{			Oncovirinae Spumaviridae Lentivirinae		
Rhabdoviridae	}				{	Vesiculovirus Lyssavirus Sigmavirus
						{

πολυεδρώσεις των Λεπιδοπτέρων και για μερικές μολύνσεις στα Υμενόπτερα που συναντώνται σε ωφέλιμα έντομα ή επιβλαβή με οικονομικό ενδιαφέρον.

Η δεύτερη περίοδος αρχίζει μετά το 2ο Παγκόσμιο πόλεμο και κυρίως στη δεκαετία του '50 όπου η ιολογία των ασπονδύλων είχε μια προοδευτική εξέλιξη που τα τελευταία χρόνια ήταν πολύ ταχεία. Έτσι, η μελέτη των περισσότερων ιολογικών ασθενειών, που παλαιότερα είχαν περιγραφεί με ένα τρόπο αρκετά συνοπτικό, έγινε σε βάθος και επιτεύχθηκε η μελέτη των χαρακτηριστικών της υπερμικροσκοπικής τους δομής και των βιοχημικών ιδιοτήτων, των περισσότερων στοιχείων τους. Τα συμπεράσματα που βγήκαν αυτή την περίοδο έχουν ιδιαίτερη σημασία διότι αυτοί οι ιοί παρουσιάζουν πολυάριθμες ομοιότητες με εκείνους που είναι γνωστοί στα βακτήρια, στα φυτά, στα ανώτερα ζώα και στον άνθρωπο.

1.2.2. Οι κυριότερες ομάδες ιών των ασπονδύλων

Η ταξινόμηση των ιών τα τελευταία χρόνια στηρίζεται, όπως αναφέρθηκε, σε ένα αριθμό μορφολογικών και κυρίως βιοχημικών κριτηρίων. Με βάση τα κριτήρια αυτά, οι ιοί των ασπονδύλων έχουν καταταγεί σε οικογένειες που περιλαμβάνουν και άλλους ιούς ζώων και φυτών που σχηματικά η μορφολογία τους και τα συγκριτικά τους μεγέθη εμφανίζονται στην Εικ. 1 (MATTHEWS, 1985).

Πριν να εκτεθούν με περισσότερες λεπτομέρειες οι κύριες ιδιότητες των Reoviridae, οικογένεια στην οποία περιλαμβάνεται ο ιός που απομονώθηκε από το δάκο, παρουσιάζονται παρακάτω οι σπουδαιότεροι χαρακτήρες των μεγάλων ομάδων των ιών των ασπονδύλων.

1.2.2.1. ΙΟΙ με DNA

1.2.2.1.1. Οι Entomorovirus

Οι ιοί που είναι υπεύθυνοι για τις ασθένειες τύπου Entomorovirus είναι γνωστοί με το όνομα ατρακτοειδή ή σφαιροειδή σωματίδια. Αρχικά περιγράφησαν (1963) από τους HURPIN and VAGO στο κολεόπτερο *Melolontha melolontha*. L. Ο τύπος της ασθένειας βρέθηκε αργότερα και σε άλλα Κολεόπτερα, σε Ορθόπτερα, σε Λεπιδόπτερα και Δίπτερα (BERGOIN, 1973). Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο τύπων εγκλειστων

σωματιδίων, ο ένας σχήματος ατρακτοειδούς και ο άλλος ωοειδούς ή παρασφαιρικού. Εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των λιπωδών ιστών και στα αιμοκύτταρα. Τα ατρακτοειδή σωματίδια αποτελούνται από ένα κρυσταλλικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα μόνο, ενώ τα σφαιροειδή περικλείουν ιολογικά σωματίδια διαστάσεων 200x400 nm, συμπλόκου συμμετρίας, σχήματος ωοειδούς ή σχεδόν παραλληλεπίπεδου. Το βίριον αποτελείται από ένα περίβλημα που η επιφάνεια του παρουσιάζει εξογκώματα σαν διάκοσμο, ώστε το σωματίδιο να έχει όψη που μοιάζει με μούρο. Το νουκλεοτίδιο στο οποίο είναι εντοπισμένο το γονιδίωμα*, είναι ένα DNA διπλονηματικό μοριακού βάρους 100-200 εκατομμυρίων daltons**. Αυτές οι μορφολογικές και βιοχημικές ιδιότητες επιτρέπουν την ταξινόμηση των Entomopoxvirus μαζί με τους Poxvirus των Σπονδυλωτών στην οικογένεια των Poxviridae (MATTHEWS, 1982).

1.2.2.1.2. Οι Baculovirus

Το γένος των Baculovirus, που φαίνεται ότι είναι εξειδικευμένο στα ασπόνδυλα, περιλαμβάνει ιούς σε σχήμα βακτηρίας μεγέθους από 100 - 350nm μήκος με 40nm πλάτος και ως θέση αναπαραγωγής έχει τον πυρήνα. Τα ιολογικά σωματίδια αποτελούνται από ένα περίβλημα με 3 χιτώνες οι οποίοι περιβάλλουν ένα ή περισσότερα κυλινδρικά νουκλεοκαψίδια. Το γονιδίωμα των Baculovirus είναι ένα διπλονηματικό DNA υπερελικοειδές, μοριακού βάρους 58-100 εκατομμυρίων daltons.

Το γένος Baculovirus που ανήκει στην οικογένεια των Baculoviridae, υποδιαιρείται σε 3 υποομάδες. Τους Baculovirus της πυρηνικής πολυέδρωσης (Nuclear Polyhedrosis Virus-NPV), τους Baculovirus των Κοκκιδίων (Granulosis Virus) και τους μη εγκλεισμένους Baculovirus (Nonoccluded Virus) (MATTHEWS, 1982).

Οι Baculovirus της πυρηνικής πολυέδρωσης (NVP) είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι στα έντομα και κυρίως στα Λεπιδόπτερα. Γενικά προκαλούν σημαντικές επιζωτίες μέσα στους φυσικούς πληθυσμούς ή στις μαζικές εκτροφές των εντόμων.

Στις ιστολογικές τομές, οι μολυσμένες προνύμφες παρουσιάζουν ένα μεγάλο αριθμό πολυεδρικών σωματιδίων στον πυρήνα των κυττάρων των διαφόρων ιστών (λιπώδη ιστό, υποδερμικά

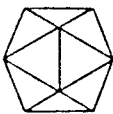

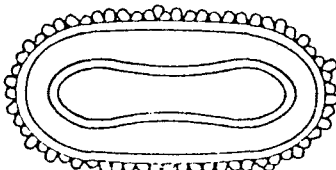







* Γονιδίωμα ή γένομα (genome): Το σύνολο του κληρονομικού υλικού (γενετικές μονάδες), χαρακτηριστικό ενός είδους.

** dalton: Μονάδα ατομικής μάζας. Είναι ίσο με $1,660 \cdot 10^{-12}$ Kg δηλαδή το 1/12 της μάζας ενός ατόμου C_{12} (του πιο γνωστού ισότοπου του άνθρακα).

EIKONA 1

Εικ. 1. Σχηματική παράσταση των οικογενειών των ιών που προσβάλλουν τα ασπόνδυλα κατά MATTHEWS, (1985).

ΟΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΤΩΝ ΙΩΝ ΠΟΥ ΜΟΛΥΝΟΥΝ ΤΑ ΑΣΠΟΝΔΥΛΑ

ΙΟΙ ΑΚΑΛΥΠΤΟΙ		ΙΟΙ ΚΑΛΥΜΜΕΝΟΙ	
<p>ds DNA</p>  <p><i>Iridoviridae</i> (<i>Tipula iridescent virus</i>)</p>	<p>ds RNA</p>  <p><i>Reoviridae</i> (<i>Bluetangue orbivirus</i>)</p>	<p>ds DNA</p>  <p><i>Poxviridae</i> (<i>Melolontha entomopoxvirus</i>)</p>	 <p><i>Baculoviridae</i> (<i>Autographa nuclear polyedrosis virus</i>)</p>
<p>ss DNA</p>  <p><i>Parvoviridae</i> (<i>Densovirus of Galleria</i>)</p>	<p>ss RNA</p>  <p><i>Nodaviridae</i> (<i>Nodamura virus</i>)</p>  <p><i>Picornaviridae</i> (<i>Cricket paralysis virus</i>) <i>Nudaurelia a virus group</i></p>	<p>ss RNA</p>  <p><i>Rhabdoviridae</i> (<i>Rabies lyssavirus</i>)</p>  <p><i>Bunyaviridae</i> (<i>Bunyamvera virus</i>)</p>  <p><i>Togaviridae</i> (<i>Sindbis alphavirus</i>)</p>	

100 nm

κύτταρα, περιτραχειακά αιμοκύτταρα κ.λπ.). Αυτά τα πολύεδρα, που είναι πρωτεϊνικής φύσεως, περικλείουν τα ιολογικά σωματίδια τα οποία μπορούν να περιέχουν ένα ή περισσότερα νουκλεοκαψίδια μέσα σε ένα κάλυμμα. Εκτός των Λεπιδοπτέρων οι Baculovirus της Πυρηνικής Πολυέδρωσης (NPV) έχουν βρεθεί στα Νευρόπτερα, στα Υμενόπτερα, στα Δίπτερα καθώς και στα Δεκάποδα Οστρακωτά. Αυτοί οι ιοί έχουν χρησιμοποιηθεί στην πράξη για μικροβιολογική καταπολέμηση εχθρών των καλλιεργειών (BURGES, 1981) (KURSTAK, 1982).

Οι Κοκκιώδεις Baculovirus, (Granulosis - GV), φαίνεται ότι είναι περισσότερο εξειδικευμένοι στη τάξη των Λεπιδοπτέρων, και είναι πολύ συχνά απαντώμενοι στα προνυμφικά στάδια. Οι ιοί αυτοί είναι πολύ συγγενείς των Baculovirus της πυρηνικής πολυέδρωσης (NPV), διαφέρουν κυρίως ως προς την ιδιότητα να περικλείονται χωριστά μέσα σε μικρά ωσειδή πρωτεϊνικά έγκλειστα σωματίδια που ονομάζονται κόκκοι (granules). Κατά τη διάρκεια της παθολόγησης οι πυρήνες καταστρέφονται γρήγορα, και στο τέλος του κύκλου της ιολογικής αναπαραγωγής πραγματοποιείται ο σχηματισμός των κοκκιδίων μέσα στο κυττόπλασμα.

Οι υποομάδες των Baculovirus χωρίς έγκλειστα σωματίδια περιλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό ιών που έχουν τα κύρια μορφολογικά και μορφογενετικά χαρακτηριστικά των Baculovirus, αλλά δεν σχηματίζουν εγκλείσματα τύπου πολυέδρου ή κοκκιδίου. Τυπικό είδος είναι ο Baculovirus του *Oryctes rhinoceros* αλλά όμοιοι ιοί έχουν περιγραφεί και σε άλλα Κολεόπτερα, Λεπιδόπτερα, Υμενόπτερα, Δίπτερα και άλλα αρθρόποδα όπως Οστρακωτά και Αραχνίδια.

1.2.2.1.3. Οι Iridovirus

Οι ιοί αυτοί είναι υπεύθυνοι για τις ιώσεις που ονομάζονται ιριδίζουσες ασθένειες των σπονδυλίων, και χαρακτηρίζονται γενικά από την εμφάνιση μιας κυανής χρώσης που οφείλεται στη διάθλαση του φωτός που διέρχεται μέσα από την παρακρυσταλλική διάταξη των τεμαχιδίων. Αυτοί οι ιοί είναι χωρίς κάλυμμα, με κυβική συμμετρία, με διάμετρο 125-300nm και έχουν ως θέση αναπαραγωγής το κυτταρόπλασμα. Το γονιδιωμά τους είναι ένα διπλονηματικό-γραμμικό DNA, μοριακού βάρους 100-250 εκατομμυρίων daltons. Ο τύπος αυτός του ιού, που αρχικά περιγράφηκε στο Δίπτερο *Tipula paludosa* (XEROS, 1954) παρατηρήθηκε και στα Λεπιδόπτερα, τα Οστρακωτά και τα Μαλάκια.

Οι ιοί αυτοί μοιάζουν με μερικούς ιούς σπονδυλιτών, όπως με τους ιούς FV3 του βατράχου, τους ιούς του αφρικανικού πυρετού των χοίρων, μαζί με τους οποίους τοποθετούνται στην οικογένεια Iridoviridae (MATTHEWS, 1982).

1.2.2.1.4. Οι Densovirus

Οι ιοί αυτοί είναι σωματίδια υπεύθυνα για τις πυκνοπυρηνώσεις (Densonucleosis) στα Δικτυόπτερα, Ορθόπτερα, Λεπιδόπτερα και Δίπτερα. Η ονομασία χαρακτηρίζει την ιδιότητα που έχουν αυτοί οι ιοί να σχηματίζουν μέσα στα κύτταρα που είναι προσβεβλημένα, υπερτροφικούς πυρήνες, περιοχές που χρωματίζονται έντονα από την αντίδραση Feulgen και που αντιστοιχούν στη μαζική συγκέντρωση βίριον. Τα βίριον αυτά είναι χωρίς περίβλημα, σχήματος εικοσαέδρου και διαμέτρου 20nm. Το γονιδίωμά τους είναι ένα μονονηματικό DNA μοριακού βάρους 1,9 εκατομμυρίων daltons. Αυτοί οι ιοί αποτελούν ένα μέρος της οικογένειας Parvoviridae (MATTHEWS, 1983) στους οποίους ανήκουν πολλοί μικροί ιοί των σπονδυλωτών όπως οι ιοί που απαντώνται στους αδένες και οι ιοί K του ποντικού.

1.2.2.2. Ιοί με RNA

Εκτός από τους Reovirus, τους οποίους θα περιγράψουμε λεπτομερώς στην παρακάτω ενότητα, γιατί σ' αυτούς κατατάσσονται ιοί που ανακαλύφθηκαν στο δάκο της ελιάς, στους ιούς των ασπονδύλων με RNA κατατάσσονται κυρίως οι παρακάτω κατηγορίες.

1.2.2.2.1. Οι Rhabdovirus

Ο πλέον γνωστός ιός αυτής της ομάδας είναι ο ιός σ (sigma) της δροσόφιλας. Ο ιός αυτός έχει την ιδιαιτερότητα να προκαλεί στα ακμαία μία κληρονομική ευαισθησία στο CO₂ (L' HERITIER, 1948). Τα σωματίδια έχουν κάλυμμα, έχουν σχήμα άμβυκα και διαστάσεις 200 nm μήκος και 70 nm πλάτος. Από τους ιούς που μορφολογικά μοιάζουν στους Rhabdovirus είναι εκείνοι, που έχουν παρατηρηθεί κυρίως στα θαλασσινά οστρακωτά. Οι ιοί σ αποτελούν μία ολόκληρη ομάδα, τους Sigmavirus, στην οικογένεια Rhabdoviridae (MATTHEWS, 1982), στην οποία περιλαμβάνονται ιοί ζώων και φυτών όπως ο ιός της φλυκταινώδους στοματίτιδας και ο ιός του κίτρινου νανισμού της πατάτας.

1.2.2.2.2. Οι Picornavirus

Είναι μικροί ιοί διαμέτρου 25-30 nm, κυβικής συμμετρίας χωρίς κάλυμμα και με θέση πολλαπλασιασμού το κυτταρόπλασμα. Το

νουκλεϊνικό οξύ είναι μονονηματικό RNA, μοριακού βάρους 2,5 εκατομμυρίων daltons. Συναντώνται στα Λεπιδόπτερα, τα Δίπτερα, τα Υμενόπτερα καθώς και σε μερικά άλλα αρθρόποδα. Παρουσιάζουν κοινές ιδιότητες με τους Enterovirus των σπονδυλωτών καθώς και με τον ιό της πολιομυελίτιδας. (MATTHEWS, 1982).

1.2.2.2.3. Οι Nodavirus

Οι ιοί αυτοί των οποίων ο κύριος εκπρόσωπος είναι ο ιός Nodamura που απομονώθηκε από ένα είδος κουνουπιών, το *Culex tritaeniorhynchus*, παρουσιάζουν την ιδιαιτερότητα να έχουν ένα καψίδιο που αποτελείται από μία μοναδική πρωτεΐνη και διάμετρο 30 nm. Η οικογένεια των Nodavirus (MATTHEWS, 1982) εμπλουτίστηκε με 5 εκπροσώπους (REINGANUM, 1982) που ανακαλύφθηκαν σε ένα Μικρολεπιδόπτερο, ένα Υμενόπτερο, δύο Κολεόπτερα και ένα Δίπτερο.

1.2.2.2.4. Οι Reovirus

Λόγω του ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, που έχουν οι ιοί αυτοί για το δάκο της ελιάς, ολόκληρη η Οικογένεια των Reoviridae θα παρουσιαστεί ξεχωριστά.

1.2.3. Ιοί της οικογένειας των Reoviridae

Μεταξύ των διαφόρων οικογενειών των ιών, η οικογένεια των Reoviridae έχει το πιο ευρύ φάσμα ξενιστών. Οι ιοί αυτοί ανευρίσκονται τόσο στα σπονδυλωτά όσο και στα ασπόνδυλα καθώς και στους μύκητες και τα ανώτερα φυτά.

Το ιολογικό σωματίδιο σχηματίζεται από ένα εικοσαεδρικό καψίδιο που αποτελείται από μία διπλή πρωτεϊνική στρώση και έχει διάμετρο 60-80 nm. Το γονιδίωμα αποτελείται από 10 έως 12 τμήματα ενός μονονηματικού γραμμικού RNA. Η εσωτερική πρωτεϊνική στρώση και το νουκλεϊνικό οξύ σχηματίζουν το κεντρικό τμήμα "core" του σωματιδίου. Η θέση αναπαραγωγής του ιού γίνεται φανερή από την συσσώρευση προϊολογικού υλικού στο επίπεδο του κυτταροπλάσματος των προσβεβλημένων κυττάρων (JOKLIK, 1974). Τα σωματίδια διαφοροποιούνται στην περιφέρεια του ιοπλάσματος. Στους ζώικους οργανισμούς η μορφογένεση

επιτελείται κυρίως μέσα στα κύτταρα του επιθηλίου των εντέρων, από αυτό δε παρατηρείται μία σημαντική αποβολή σωματιδίων μέσα στο εσωτερικό του εντερικού σωλήνα.

1.2.3.1. Διάφορες ομάδες των Reovirus

Με βάση τα μορφολογικά, βιοχημικά και βιολογικά κριτήρια, οι Reovirus ομαδοποιούνται σε 6 γένη μέσα στην οικογένεια των Reoviridae (MATTHEWS, 1982).

1.2.3.1.1. Οι Reovirus

Η ομάδα περιλαμβάνει ιούς, που απαντούν και στα σπονδυλωτά. Οι ιοί αυτοί διακρίνονται σε 3 ορότυπους. Τα σωματίδια αποτελούνται από ένα κεντρικό τμήμα "core" που περικλείει το γονιδίωμα που αποτελείται από 10 τμήματα RNA. Το κεντρικό τμήμα η "core" σχηματίζεται με βάση πρωτεϊνικές υποομάδες ή καψομερή που έχουν 12 κενές προεκτάσεις εσωτερικά, που οριοθετούν τις κορυφές ενός εικοσαέδρου. Στη συνέχεια, αυτή η πρώτη δομή του εικοσαέδρου υπερκαλύπτεται από μία δεύτερη στρώση καψομερών.

1.2.3.1.2. Οι Orbivirus

Τα σωματίδια των ιών αυτών είναι διαμέτρου 65-80 nm, ομοιάζουν με εκείνα του γένους Reovirus, αλλά διαφέρουν από τον αριθμό των πολυπεπτιδίων του καψιδίου και από το δακτυλιοειδές σχήμα των χονδρών καψομερών. Αν και καταχωρούνται ως ιοί των σπονδυλωτών, όμως τα στοιχεία αυτά πολλαπλασιάζονται δραστήρια και σε έντομα, που είναι φορείς των ιών αυτών. Υπάρχουν 17 ορολογικές ομάδες. Τυπικό είδος των ιών αυτής της ομάδας είναι ο ιός FMDV (Food and Mouth Disease Virus).

1.2.3.1.3. Οι Rotavirus

Είναι ιοί που μοιάζουν με αυτούς των δύο προηγουμένων ομάδων, με διάμετρο 65-75 nm. Το γονιδίωμά τους αποτελείται από 11 τμήματα ενός διπλονηματικού RNA. Έχουν απομονωθεί από σπονδυλωτά στα οποία είναι υπεύθυνοι για τις διάρροιες (SCHERRER et al. 1976).

1.2.3.1.4. Οι Phytoreovirus

Οι ιοί αυτοί έχουν διάμετρο 70 nm και διπλονηματικό RNA που έχει 12 τμήματα. Το καψίδιο σχηματίζεται από δύο πρωτεϊνικά στρώματα χωρίς προεκτάσεις. Τα σωματίδια αυτά προκαλούν όγκους και νανισμό στα φυτά. Οι ασθένειες αυτές μεταφέρονται από ενδιάμεσους φορείς έντομα Ομόπτερα της οικογένειας Cicadellidae στα οποία οι ιοί αυτοί πολλαπλασιάζονται. Το είδος-τύπος είναι ο ιός τύπου WTV που προκαλεί όγκους στα γέωμηλα (Wood Tumor Virus).

1.2.3.1.5. Οι Fijiivirus

Οι ιοί αυτοί απαντώνται στα φυτά, έχουν διάμετρο περίπου 70 nm και την ιδιότητα να διαθέτουν 12 προεκτάσεις στο επίπεδο των πρωτεϊνικών στρώσεων των καψιδίων που τοποθετούνται στις κορυφές ενός εικοσαέδρου. Το νουκλεϊνικό οξύ είναι διπλονηματικό RNA και αποτελείται από 10 τμήματα. Τα σωματίδια πολλαπλασιάζονται μέσα στα έντομα φορείς και μεταφερόμενα στα φυτά προκαλούν μία ανεξέλεγκτη παραγωγή κυττάρων στο δευτερεύον ξύλο. Το είδος τύπος είναι ο ιός της ασθένειας Fiji του σακχαροκαλάμου.

1.2.3.1.6. Οι Cyrovirus ή ιοί της κυττοπλασμικής πολυεδρώσης

Οι ασθένειες που ονομάζονται κυττοπλασμικές πολυεδρώσεις, εμφανίζονται κυρίως στις προνύμφες Λεπιδοπτέρων όπου απαντώνται συχνά. Χαρακτηρίζονται από το ότι αναπτύσσονται μέσα στα κύτταρα του μεσεντέρου και σχηματίζουν πολυεδρικά εγκλειστικά σωματίδια ποικίλου μεγέθους και σχήματος. Αυτά, περιέχουν τα ιολογικά σωματίδια που έχουν διάμετρο 50-60 nm και όπως ο μεγαλύτερος αριθμός των άλλων ομάδων Reovirus, έχουν 12 προεκτάσεις που είναι κενές και τοποθετούνται στις 12 κορυφές του εικοσαέδρου. Η ταξινόμηση στηρίζεται στο μέγεθος των διαφόρων τμημάτων του RNA, πράγμα που πρόσφατα επέτρεψε τη διαφοροποίηση των Cyrovirus σε 11 τύπους. (PAYNE and RIVERS, 1976)

1.2.3.1.7. Οι μη έγκλειστοι ιοί του τύπου Reovirus στα ασπόνδυλα

Εκτός από τις 6 ομάδες που παρουσιάστηκαν παραπάνω κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών έχουν γίνει γνωστοί στα ασπόνδυλα, ιοί των οποίων η μορφολογία, η θέση τους στον κυττοπλασμικό πολλαπλασιασμό και για ορισμένους οι βιοχημικοί χαρακτήρες, επιτρέπουν την κατάταξή τους στους Reovirus, αλλά χωρίς ακόμη να έχει αποσαφηνισθεί το επίπεδο της ταξινόμησης. Οι ιοί του δάκου που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας, ανήκουν σε αυτές τις ομάδες ιών.

1.2.3.2. Ιοί του τύπου Reovirus που έχουν παρατηρηθεί στα ασπόνδυλα (εκτός εντόμων)

Στους Πλατυέλμινθες: Οι MOKHTAR-MAAMOURI et al. (1976) επεσήμαναν ιούς του τύπου Reovirus στο *Diplectanum aequans* (Wagener). Αυτοί είναι σωματίδια με πολυγωνικό περίβλημα διαμέτρου 66-70 nm και έχουν ένα καψίδιο με διπλή πρωτεϊνική στρώση.

Στα Μαλάκια: Οι DEVAUCHELLE and VAGO (1971) περιέγραψαν ιολογικά σωματίδια τύπου Reovirus, που βρίσκονται στο επίπεδο του πεπτικού οργάνου της σουπιάς *Sepia officinalis*. Αυτά έχουν διάμετρο 75 nm και θέση πολλαπλασιασμού το κυττόπλασμα.

Ο VAGO (1966) ανακαλύπτει στα καβούρια *Macropipus depulator* τον πρώτο ιό στα Οστρακωτά, που προσεγγίζει τους Reovirus. Το 1976 ο BONANI περιγράφει έναν ιό του τύπου Reovirus που ήταν υπεύθυνος για μια μεγάλη θνησιμότητα στο είδος αυτό των οστρακωτών. Τα σωματίδια των 60 nm διαμέτρου και η κυττοπλασματική αναπαραγωγή που παρατήρησε, προσεγγίζουν στην αρχική περιγραφή του VAGO (1966).

Ο JOHNSON (1977) επισημαίνει στα καβούρια *Callinectes sapidus* τεμαχίδια των 55 nm διαμέτρου που έχουν RNA ως νουκλεϊνικό οξύ και θέση αναπαραγωγής το κυτταρόπλασμα.

Στα Αραχνίδια: Ο MOREL το 1975 περιγράφει στους σκορπιούς *Buthus occitanus* μία ιολογική ασθένεια της οποίας τα στοιχεία αναπαράγονται μέσα στον ηπατοπαγκρεατικό ιστό, τα βίριον είναι σχήματος εικοσαεδρικού, διαμέτρου 60-65 nm και περιέχουν RNA. Το καψίδιο σχηματίζεται από δύο πρωτεϊνικές στρώσεις και το κεντρικό τμήμα "core" του σωματιδίου έχει διάμετρο 40-45nm.

1.2.3.3. Ιοί του τύπου Reovirus που παρατηρήθηκαν στα έντομα

Μία από τις πρώτες δημοσιεύσεις που έγιναν σχετικές με την παρουσίαση ενός ελεύθερου ιού Reovirus στα έντομα, ήταν αυτή που έδωσαν οι KRIEG and HUGER το 1960 και αφορούσε την ασθένεια που ονομάζεται "Wassersucht" στο *M. melolontha*. Οι συγγραφείς αυτοί περιγράφουν ως υπεύθυνο παράγοντα της ασθένειας, ένα ιό RNA που μορφολογικά μοιάζει με τους ιούς της κυττοπλασμικής πολυέδρωσης αλλά χωρίς σχηματισμό έγκλειστων σωματιδίων.

Αργότερα, οι PLUS et al. (1975, 1981) ανακάλυψαν και μελέτησαν στο *C. capitata* ελεύθερους ιούς του τύπου Reovirus. Οι ιοί αυτοί ονομάζονται αντίστοιχα F και I και έχουν διάμετρο 60-69nm. Το γονιδίωμα χαρακτηρίζεται από διπλονηματικό RNA που αποτελείται από 10 τμήματα.

Ο MOUSSA το 1975 επισημαίνει στο *Dacus tryoni* ένα ιολογικό σωματίδιο τύπου Reovirus, διαμέτρου 40-65 nm. Ο ίδιος συγγραφέας παρατήρησε το 1977 έναν ιό του ίδιου τύπου διαμέτρου 75-76 nm στην οικιακή μύγα (*Musca domestica*).

1.2.4. Ιοί των Διπτέρων

Οι βιβλιογραφικές αναφορές που υπάρχουν για τις ιώσεις διαφόρων ειδών Διπτέρων είναι πάνω από 1000. Ο αριθμός των ειδών που προσβάλλονται από διάφορους ιούς είναι άνω των 230 (MARTIGNONI και IWAI, 1986). Από την αναζήτηση στοιχείων που αναφέρονται στην ιογενή παθολογία του δάκου της ελιάς, της γνώσης των φαινομένων που προκαλούν οι ιοί στα δίπτερα και την διερεύνηση της πιθανής ευαισθησίας του εντόμου στις ιώσεις με στοιχεία από άλλα συγγενή είδη, έγινε μία βιβλιογραφική μελέτη που παρουσιάζεται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I, με τίτλο "Οι ιοί των Διπτέρων".

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για την πραγματοποίηση της μελέτης των ιώσεων στο Δάκο της ελιάς χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι διαγνωστικής και πειραματικής παθολογίας σε πληθυσμούς εντόμων που προέρχονταν από μία ποικιλία βιοτόπων της Ελλάδας καθώς και σε έντομα που εκτρέφονταν στο εργαστήριο.

Στην πειραματική παθολογία οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν ήταν: των τεχνητών μολύνσεων των δάκων με διάφορους τύπους ιών, της αναζήτησης και της απομόνωσης ιώσεων σε φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου. Στη διαγνωστική παθολογία οι κυτταρολογικές τεχνικές είχαν ως αντικείμενο την παρατήρηση ιών με μεθόδους μικροσκοπίας.

Κατά τη διάρκεια των εργασιών έγιναν διαγνώσεις νέων ιών και πραγματοποιήθηκαν επαναληπτικές δοκιμές με διάφορες φυγοκεντρήσεις μέχρι να οριστικοποιηθεί η τεχνική καθαρισμού τους κατόπιν ακολούθησαν οι τεχνικές εκείνες που σκοπό είχαν τον προσδιορισμό των βιοχημικών τους ιδιοτήτων.

Στο μέρος αυτό αναφέρονται οι σχετικές πληροφορίες για το έμβιο υλικό και η γενική μεθοδολογία της εργασίας που ακολουθήθηκε.

2.1. ΤΟ ΕΜΒΙΟ ΥΛΙΚΟ

2.1.1. Προέλευση εντόμων

Τα ακμαία του δάκου της ελιάς (Εικ. 2) που χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση ιώσεων προέρχονταν από προσβεβλημένο ελαιόκαρπο που λήφθηκε από τους ακόλουθους 22 διαφορετικούς βιότοπους της χώρας μας και που ήταν οι:

Αττική: Κηφισιά, Μαραθώνας, Κρυονέρι, Αχαρνές.
Αργολίδα: Ιρία, Επίδαυρος, Τολό
Βοιωτία: Τανάγρα, Ξηρονομή, Μάζι
Κέρκυρα: Λευκίμη
Κορινθία: Καμάρι, Κιάτο
Κρήτη: Χανιά, Ρέθυμνο, Αλικιανός

Εύβοια: Ροβιές, Κάρυστος
Μαγνησία: Πήλιο
Σάμος: Πυθαγόρειο
Φθιώτιδα: Γοργοπόταμος
Φωκίδα: Λιδωρίκι

Στις πειραματικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν έντομα ημιτεχνητής εκτροφής του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Παθολογίας Εντόμων του Μ.Φ.Ι., (βλέπ. 2.1.2), καθώς και έντομα που προέρχονταν από την τεχνητή εκτροφή του Εργαστηρίου Εντομολογίας του ΕΚΕΦΕ "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ". Αυτά είχαν εκτραφεί σύμφωνα με τη μέθοδο του TSITSIPIS (1975), η οποία είναι βελτιωμένη μέθοδος του TZANAKAKIS (1967). Τα έντομα είχαν χαρακτηριστικό του τόπου προέλευσης ΑΤ και ο αριθμός των γενεών που είχε εκτραφεί στο Εργαστήριο σε τεχνητές τροφές ήταν μεγαλύτερος των 30.

2.1.2. Εργαστηριακή εκτροφή

Η εκτροφή των εντόμων στο εργαστήριο γινόταν για κάθε βιότοπο χωριστά και με την ακόλουθη διαδικασία.

Οι προσβεβλημένες ελιές τοποθετούνταν σε πλαστικά κουτιά. Το κάθε κουτί έφερε δύο πλάγια ανοίγματα με μεταλλικό πλέγμα για αερισμό, ενώ στη βάση υπήρχε ψιλό ροκανίδι ξύλου και ένα μεταλλικό πλέγμα που συγκρατούσε τον ελαιόκαρπο. Η συλλογή των νυμφών ή των προνυμφών γινόταν ευχερώς κοσκινίζοντας το ροκανίδι. Τα κουτιά με τον ελαιόκαρπο διατηρούνταν σε χώρο με θερμοκρασία 26-27°C, σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 18 ωρών φως το 24ωρο. Για όλη την περίοδο της ζωής των εντόμων οι συνθήκες διατήρησης παρέμειναν οι ίδιες.

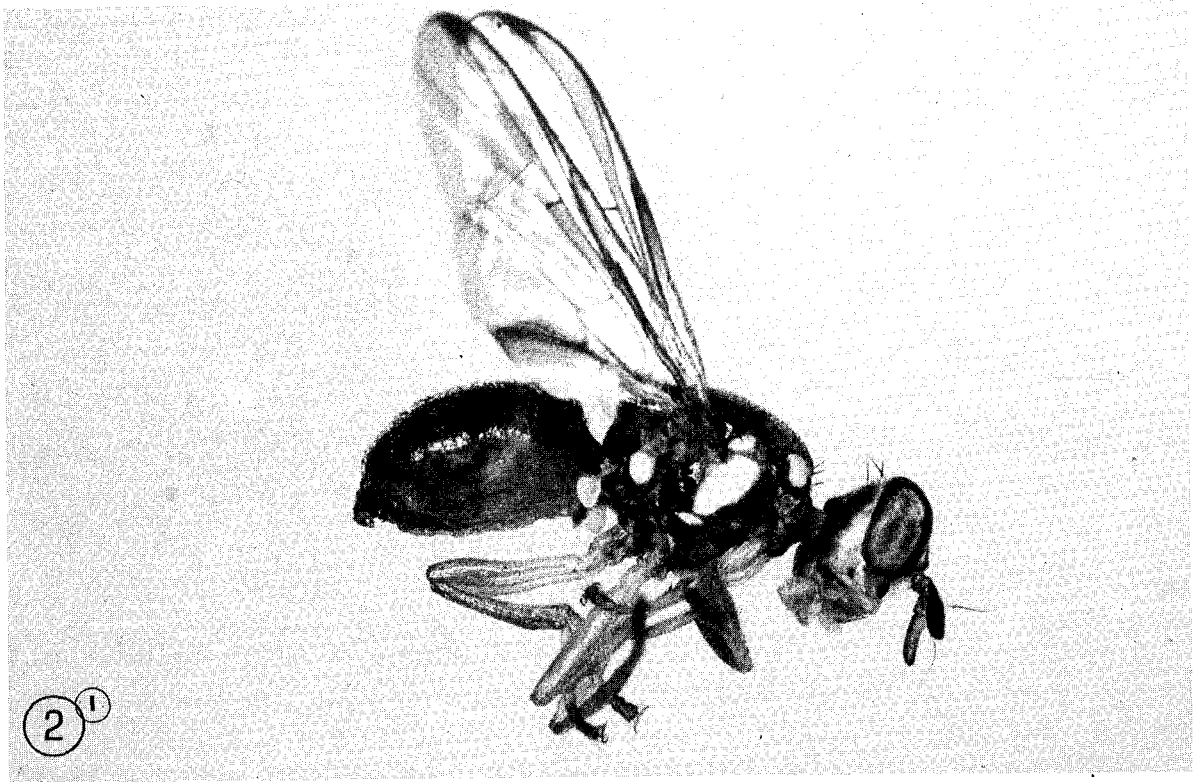
Η εκτροφή ξεκινούσε με την έξοδο των ακμαίων από τις νύμφες που είχαν τοποθετηθεί μέσα σε ξύλινους κλωβούς διαστάσεων 30X30X30 cm που φέρουν γυαλί από την εμπρός πλευρά, φορμάϊκα από την πλευρά του δαπέδου, ξύλο (κόντρα πλακέ) με άνοιγμα πόρτας από την πίσω πλευρά και μεταλλικό πλέγμα από τις άλλες πλευρές (HAGEN, 1963).

Στις περιπτώσεις τεχνητών μολύνσεων των εντόμων ή άλλων μετρήσεων χρησιμοποιούνταν κυλινδρικοί κλωβοί από "Plexiglass" για να γίνεται η απολύμανση των λείων επιφανειών των κλωβών ευκολότερη και ασφαλέστερη. Οι κυλινδρικοί κλωβοί έχουν βάση 30cm και ύψος 32cm. Η άνω επιφάνεια καλύπτεται με μεταλλικό πλέγμα για αερισμό, ενώ η κάτω με "Plexiglass". Στην κυλινδρική επιφάνεια ένα είδος πόρτας διαμέτρου 15cm από το ίδιο υλικό, επιτρέπει τους διάφορους χειρισμούς.

EIKONA 2

Εικ. 2. Θήλυ του *Dacus (Bactrocera) oleae* (GMEL)

Εικ. 2¹ Άρρεν του *Dacus (Bactrocera) oleae* (GMEL)



Για τροφή των ακμαίων χρησιμοποιούνταν θρεπτικό διάλυμα της παρακάτω συστάσεως: 30 gr μέλι, 30gr ζάχαρη, 10gr υδρολυμένη ζύμη και 30ml νερού (τροποποιημένη σύνθεση από ΣΑΝΤΑΣ, 1966). Η τροφή τοποθετείτο με μικρές σταγόνες μέσα σε τριβλία PETRI. Συμπληρωματικά μία μικρή φιάλη με νερό βρύσης και ένα φύλλο σπόγγου τύπου "WETTEX" βυθισμένο στο νερό κάλυπτε τις ανάγκες των εντόμων σε νερό.

Ο πολλαπλασιασμός των εντόμων που προέρχονταν από κάθε βιότοπο γινόταν χωριστά επάνω σε πράσινο ελαιόκαρπο που διατηρούνταν στο ψυγείο (SACANTANIS, 1953). Αρχικά ελαμβάνονταν από ένα δείγμα άνω των 300 νυμφών αγρίου δάκου ανά βιότοπο. Στη συνέχεια τα έντομα πολλαπλασιάζονταν ανάλογα των πειραματικών αναγκών. Τα νεκρά άτομα από τις εκτροφές διατηρούνταν στην κατάψυξη για τον παραπέρα έλεγχο των ιώσεων των εντόμων.

Για την αναζήτηση ιών σε ωά του *D. oleae* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των κωδώνων από μίγμα παραφίνης που αποτελούνταν από 10 μέρη παραφίνης σημείου τήξεως 52°-53°, 1 μέρος σημείου τήξεως 46°-48° και 0,7 μέρη κεριού μέλισσας (ECONOMOPOULOS and TZANAKAKIS, 1967, HAGEN et al., 1963).

Τα έντομα τεχνητής εκτροφής, που προέρχονταν από το Εργαστήριο Εντομολογίας του ΕΚΕΦΕ "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ" λαμβάνονταν στο στάδιο της νύμφης και μετά την έξοδο των ακμαίων από το νυμφικό περίβλημα εκτρέφονταν κατά τον ίδιο τρόπο και διατηρούνταν σε ίδιες συνθήκες με τους δάκους που προέρχονταν από προσβεβλημένες ελιές. Αρκετές χιλιάδες από τα έντομα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον τεχνητό πολλαπλασιασμό ιών παρέχοντάς τους μολυσμένη τροφή, ώστε να αποκτηθεί αρκετό υλικό κατάλληλο για τις διάφορες εργασίες που αφορούσαν μελέτες βιοχημικών και άλλων ιδιοτήτων.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

2.2.1. Τεχνική μολύνσεως

2.2.1.1. Μόλυσμα

Οι μολύνσεις των ακμαίων γίνονταν με ιολογικό αιώρημα που λαμβανόταν μετά από λειοτρίβηση μολυσμένων δάκων μέσα σε διάλυμα Ringer (φυσιολογικός ορός εντόμων). Σε 1 ml διαλύματος

Ringer λειοτριβόνταν 12-15 άτομα.

Μετά τη διαύγαση (clarification) με φυγοκέντρηση σε 2500g για 15 λεπτά, το αιώρημα φιλτραριζόταν διαδοχικά με μεμβράνες που είχαν διάμετρο πόρων 0,8 μm και 0,45 μm. Το αιώρημα αυτό χρησιμοποιούνταν ως μολυσματικό υλικό.

2.2.1.2. Μόλυνση *per os*

Οι δοκιμές μόλυνσης δια της στοματικής οδού (*per os*), πραγματοποιήθηκαν με τη χορήγηση μολυσμένης τροφής στα έντομα, αμέσως μετά την έξοδό τους από το νυμφικό περίβλημα. Η δοσομετρική εκτίμηση του μολύσματος είναι δύσκολη και το μόνο στοιχείο που λήφθηκε υπόψη ήταν η συγκέντρωση των ιών. Το μέτρο σύγκρισης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο 2 ιολογικών σωματιδίων κατά μέσο όρο κατά οπή του μικροσκοπικού εσχарωτού πλέγματος (*grill*). Σε περίπτωση που δεν επιτυγχανόταν αυτή η προϋπόθεση γινόταν διόρθωση με νέα φυγοκέντρηση για συμπύκνωση ή πρόσθεση Ringer για αραιώση.

2.2.1.3. Μόλυνση με έγχυση

Μολύνσεις των εντόμων έγιναν και με έγχυση (ένεση) ιολογικού αιωρήματος στη γενική κοιλότητα του εντόμου με τη βοήθεια συστήματος μικροεγχυτή (σύστημα L' HERITIER, 1952).

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ακμαία έντομα ηλικίας 2-3 ημερών που τοποθετούνταν ανά 20 μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες και μολύνονταν αφού προηγουμένως αναισθητοποιούνταν με αιθέρα (*diethyl ether*).

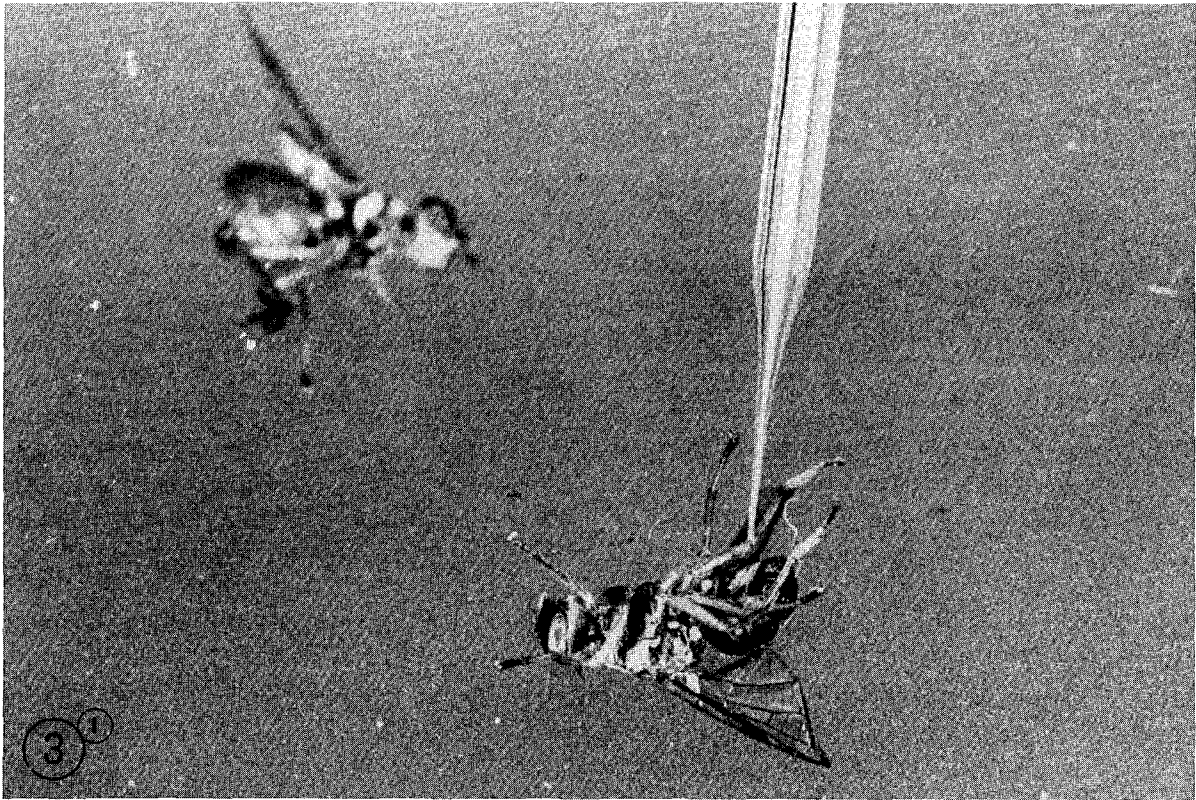
Η ένεση (έγχυση) γινόταν κάτω από στερεοσκόπιο. Το σύστημα του μικροεγχυτή καταλήγει σε πολύ λεπτή βελόνη σύριγγας (Εικ. 3). Μετά την εισαγωγή της βελόνης στη κοιλιακή χώρα του εντόμου το υγρό εισχωρεί με τη βοήθεια πεπιεσμένου αέρα που παράγεται από μικροαντλία.

Λεπτομέρειες της συσκευής του μικροεγχυτή φαίνονται στην Εικ. 4. Η διάταξη του συστήματος αποτελείται από ένα στερεοσκόπιο και ένα σύστημα μικροέγχυσης. Στο σύστημα της μικροέγχυσης υπάρχει μία γυάλινη μικροσύριγγα που είναι προσαρμοσμένη στο άκρο ενός λεπτού ελαστικού σωλήνα. Το άλλο άκρο του σωλήνα συνδέεται με ένα τριοδικό διακόπτη νερού. Στο σύστημα προσαρμόζεται αντλία αέρος ή αντλία ενυδρείου που αρχίζει να λειτουργεί με τη διόδο του ηλεκτρικού ρεύματος. Η πρώτη θέση του τριοδικού διακόπτη με τις δύο κατευθύνσεις του

EIKONA 3

Εικ. 3 Μικρομόλυνση στο μικροσκόπιο. Διακρίνεται η μεταλλική άκρη (P) και η χάλκινη πλάκα (C), από όπου παρέχεται ηλεκτρική τροφοδοσία της μικροαντλίας, καθώς και η μεταλλική πλάκα (L) του στερεοσκοπίου. Η γυάλινη μικροβελόνη (M) είναι έτοιμη για την έγχυση.

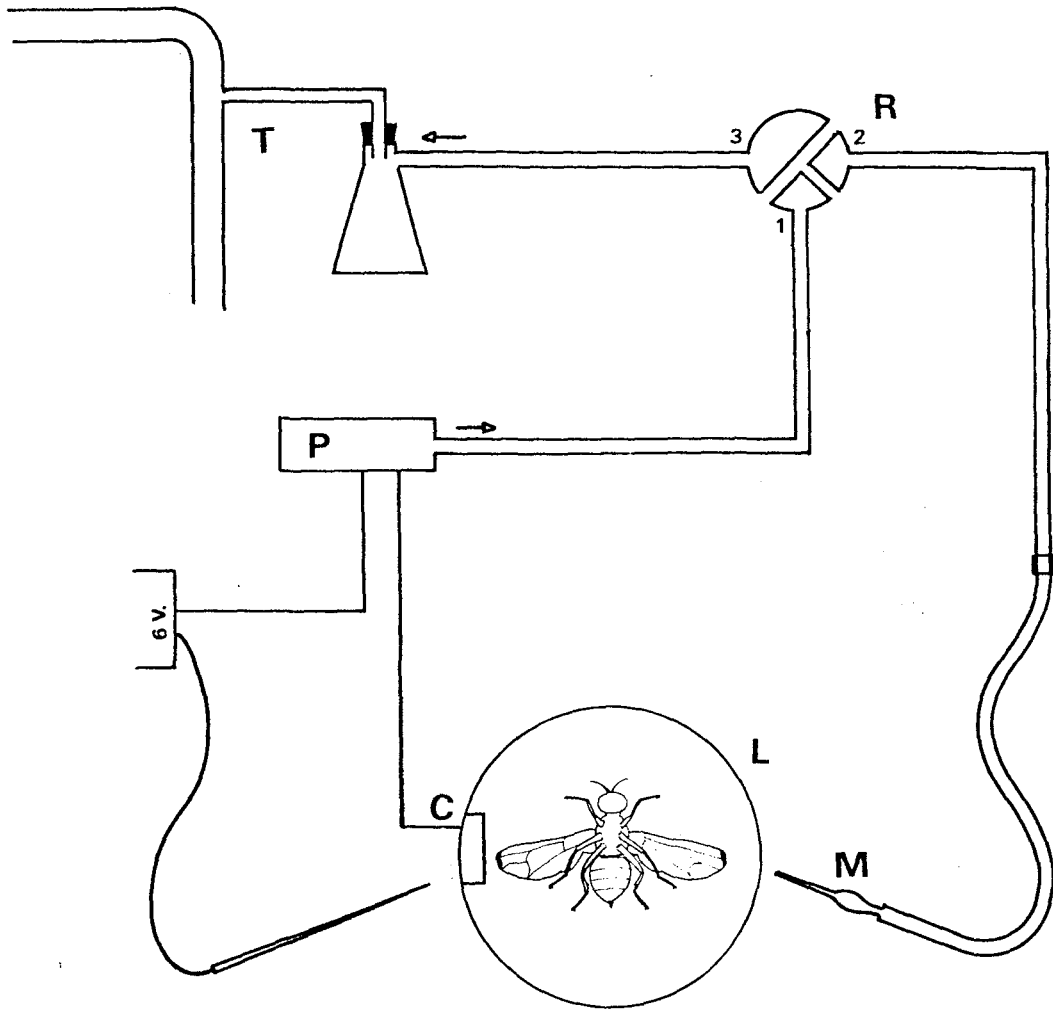
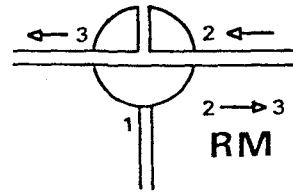
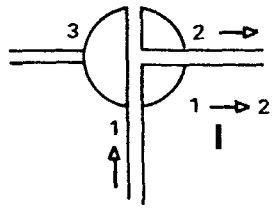
Εικ. 31. Λεπτομέρεια από την ένεση. Εμφύτευση στην κοιλιά του εντόμου της γυάλινης μικροβελόνης.



EIKONA 4

Εικ. 4. Συναρμολόγηση της συσκευής που μολύνει με ένεση μικρά έντομα. Κατά την τεχνική L' HERITIER (1952).

- I: Θέση του διακόπτη νερού για έγχυση.
- RM: " " " " " αναρρόφηση
- R: Διακόπτης νερού, αναστρεφόμενος
- T: Σιφώνιο κενού
- P: Αντλία
- C: Χάλκινη πλάκα επαφής
- L: Μεταλλική πλάκα στερεοσκοπίου (κράμα πλατίνης)
- M: Μικροβελόνη έγχυσης.



4

νερού ανοικτές, επιτρέπει στο χειριστή να γεμίσει τη μικροβελόνη με το ενέσιμο διάλυμα, καθώς δημιουργείται κενό, ενώ με τη δεύτερη όπου είναι ανοικτή η διόδος από την αντλία αέρος, πιέζεται το υγρό στο σώμα του εντόμου. Το σύστημα βασίζεται στη δημιουργία πίεσης που προκαλείται, όταν λειτουργήσει η αντλία με δίοδο ηλεκτρικού ρεύματος. Τη στιγμή της έγχυσης εξασφαλίζεται η λειτουργία της μικροαντλίας αέρος με το κλείσιμο του ηλεκτρικού κυκλώματος, που γίνεται με την επαφή μιας μεταλλικής ακίδας στη μεταλλική πλάκα του στερεοσκοπίου.

Η επιτυχία της έγχυσης γίνεται αντιληπτή από την διόγκωση της κοιλιάς του εντόμου. Ο μέσος όγκος του ιολογικού μολύσματος κυμαίνεται μεταξύ 0,25 και 0,35 μl κατά έντομο, ανάλογα με το μέγεθός του. Ο χειρισμός αυτός είναι αρκετά λεπτός και χρειάζεται μεγάλη προσοχή για την αποφυγή τραυματισμού του εντόμου.

Τα έντομα μετά την τεχνητή μόλυνση, αφού περνούσαν την περίοδο νάρκωσης, τοποθετούνταν μέσα σε κλωβούς για την παρακολούθηση της επιβίωσής τους. Ο αριθμός των εντόμων που νεκρώνονταν στις 24 πρώτες ώρες αφαιρείτο για να εξαλειφθεί ο παράγοντας τραυματικής θνησιμότητας. Στον υπόλοιπο αριθμό εντόμων καθημερινά γινόταν καταγραφή της επιβίωσης και τα νεκρά ελέγχονταν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για παρουσία ιών.

2.2.2. Αναζήτηση και απομόνωση ιών

2.2.2.1. Σε φυσικούς πληθυσμούς του *D. oleae*

Η διαπίστωση της παρουσίας ιών γινόταν σε δείγματα ακμαίων ατόμων που προέρχονταν από διαφορετικούς βιότοπους. Το δείγμα των εντόμων κάθε βιότοπου είχε ληφθεί από προσβεβλημένο καρπό 3 τουλάχιστον δένδρων. Ένας αριθμός 100 περίπου ακμαίων λειοτριβόταν με την προσθήκη Ringer σε αναλογία 12-15 έντομα ανά 1 ml Ringer.

Το λειοτρίβημα των εντόμων διαυγαζόταν στην αρχή με φυγοκέντρηση μικρής ταχύτητας (2500 g). Το αιώρημα που λαμβανόταν στη συνέχεια φυγοκεντρείτο σε 150.000 g για 1 ώρα. Με αυτό τον τρόπο διαχωρίζονταν τα τυχόν υπάρχοντα ιολογικά σωματίδια και συγκεντρώνονταν στο ίζημα. Το ίζημα που λαμβανόταν από την υπερφυγοκέντρηση, διασπειρόταν με τη βοήθεια υπερήχων και στη συνέχεια εξετάζονταν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετά από προσθήκη φωσφοροβολφραμικού οξέος (PTA).

2.2.2.2. Αναζήτηση ιών σε αποχωρήματα εντόμων

Τα αποχωρήματα των εντόμων που αποτίθονταν επάνω στα τοιχώματα των κλωβών λαμβάνονταν διαλυόμενα σε μία σταγόνα νερό με τη βοήθεια μιας πιπέτας. Τα διαλύματα αυτά μετά την επίδραση του ΡΤΑ για αρνητική χρώση παρατηρούνταν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για τον έλεγχο της παρουσίας ιών.

2.2.2.3. Μελέτη της επίδρασης ιών στην βιοσιμότητα του ξενιστή

Ο τρόπος της δράσης των ιολογικών μολύνσεων στους πληθυσμούς ακμαίων δάκου που προέρχονταν από διάφορους βιότοπους έγινε αντικείμενο διερεύνησης, μετρώντας την εξέλιξη της θνησιμότητας σε σχέση με το χρόνο.

Δείγμα προσβεβλημένου ελαιοκάρπου από 3 τουλάχιστον δένδρα λαμβάνονταν και τοποθετούνταν σε κουτιά, όπου αναμενόταν η έξοδος των προνυμφών πριν το στάδιο της νύμφωσης ή των τελείων εντόμων.

Δάκοι που είχαν την ίδια ηλικία και μέχρι 3 ημερών διαφορά και την ίδια προέλευση τοποθετούνταν στον ίδιο κλωβό σε πυκνότητες από 100 μέχρι 200 άτομα. Οι συνθήκες διατήρησης και ο τρόπος διατροφής έγινε όπως έχει αναφερθεί προηγούμενα. Κάθε ημέρα καταγραφόταν η θνησιμότητα για κάθε κλωβό. Στους κλωβούς που η θνησιμότητα ήταν μεγάλη και ο μέσος όρος επιβίωσης κάτω των 20 ημερών, τα άτομα θεωρούνταν ύποπτα ασθενείας. Τα νεκρά έντομα φυλάσσονταν σε κατάψυξη για περαιτέρω παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, με προτεραιότητα στην εξέταση εκείνων που παρατηρούνταν οι μεγαλύτερες θνησιμότητες.

2.3. ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.3.1. Οπτική μικροσκοπία

Μελέτη των ιολογικών εγκλεισμάτων έγινε σε κοινό μικροσκόπιο (σύνθετο). Τα παρασκευάσματα χωρίς χρώση παρατηρήθηκαν με φακούς αντίθεσης φάσεων. Με τους φακούς κατευθείαν φωτισμού παρατηρήθηκαν τα παρασκευάσματα που είχαν χρωσθεί με κυανούν του μεθυλενίου (Bleu de methylene de

Loffler) ή με την μέθοδο May - Grunwald - Giemsa, που είναι κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές (LANGERON, 1949), (BUJARD, 1950).

2.3.2. Ηλεκτρονική μικροσκοπία

2.3.2.1. Αρνητική χρώση ιολογικών αιωρημάτων

Τα αιωρήματα των ιών, που λαμβάνονται μετά από καθάρισμα του λειοτριβημένου πολτού των εντόμων με φυγοκεντρήσεις, τοποθετούνταν επάνω στα ειδικά λεπτά εσχαρωτά πλέγματα (grids) που είχαν καλυφθεί από ένα λεπτό στρώμα κολλοδιούχου άνθρακα. Μετά από επίδραση 1% φωσφοροβολφραμικού οξέος (PTA), pH 7,4, κατά τη μέθοδο των BRENNER και HORNE (1959), επιτυγχανόταν αρνητική χρώση και τα δείγματα ήταν κατάλληλα για παρατήρηση.

2.3.2.2. Προσήλωση και εγκλεισμός ιστών

Για την επισήμανση του ιού ή των οργάνων στα οποία πραγματοποιείται η ιολογική αναπαραγωγή, έγινε ιστολογική μελέτη στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Η προσήλωση και ο εγκλεισμός διαφόρων οργάνων των εντόμων που είχαν μολυνθεί με φυσικό τρόπο ή με έγχυση έγινε μέσα σε εγκλειστικό "EPON". Στα μέρη των εντόμων που προορίζονταν για αυτού του είδους την εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έγιναν οι ακόλουθοι χειρισμοί:

-Προσήλωση με γλουταρική αλδεΐδη 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου (sodium cacodylate - $C_5H_6AsO_2Na$) με pH 7,4 για 1 ώρα.

-Πλύσιμο σε κακοδυλικό διάλυμα με 5% σάκχαρη.

-Επαναπροσήλωση σε οσμικό οξύ 2% επί 1 ώρα στους 4°C.

-Αφυδάτωση σε ένα βαθμιδωτής πυκνότητας διάλυμα ακετόνης 35-100%.

-Εγκλεισμός σε "EPON".

Ο τελευταίος χειρισμός πραγματοποιείται σε στάδια, που είναι τα εξής:

-Λουτρό σε μείγμα ακετόνης - ύδατος 50%-50%

-Δεύτερο λουτρό σε "EPON" καθαρό για 5 έως 6 ώρες.

-Κύριος εγκλεισμός σε καθαρό "EPON". Γίνεται σε κάψουλες ζελατίνης τελείως στεγνές. Ο πολυμερισμός της ρητίνης πραγματοποιείται σε κλίβανο, για 24 ώρες στους 60°C.

Τα εγκλείσματα φυλάσσονταν παρουσία της αφυδακτικής ουσίας ACTIGEL.

Οι υπερμικροσκοπικές τομές των εγκλεισμάτων πραγματοποιούνται σε υπερμικροτόμο και παραλαμβάνονται στα χάλκινα λεπτά εσχарωτά πλέγματα (grids).

Οι υπερμικροσκοπικές τομές προσηλώθηκαν με αντίθετη χρώση σε οξικό ουρανύλιο (uranyl acetate) και σε κιτρικό μόλυβδο (plomb citrate) σύμφωνα με τη μέθοδο του REYNOLDS (1963). Τα παρασκευάσματα μελετήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο HITACHI HU II.

2.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΩΝ

Η λειοτρίβηση των εντόμων γινόταν σε ένα θρυματοποιητή POTTER, σε αναλογία 12-15 έντομα ανά 1ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (phosphate buffer) 0,05 M με pH 7,4 (HUMASON, 1967). Το αιώρημα το οποίο λαμβανόταν, διαυγάζοταν με φυγοκέντρηση σε 2500g για 1 ώρα. Τα ιζήματα επαναδιασπείρονταν με υπερήχους μέσα στα διαλύματα που είχαν προηγουμένως φυγοκεντρηθεί αφού είχε προστεθεί 0,3% δεσοξυχολικό νάτριο (sodium deoxycholate).

Το αιώρημα που λαμβανόταν έμπαινε επάνω από ένα βαθμιδωτής πυκνότητας διάλυμα σακχαρόζης 10%-50% (βάρος προς βάρος) και φυγοκεντρωνόταν σε 150.000g για 1 ώρα. Για τον πλήρη καθαρισμό των ιών τα κλάσματα από το βαθμιδωτό σακχαρικό διάλυμα τοποθετούνταν για διαπίδυση σε ημιπερατή μεμβράνη στους 4°C μέσα σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,05M με pH 7,4 για 48 ώρες με ανανέωση του διαλύματος κάθε 8 ώρες. Τα ληφθέντα διαλύματα μετά από αυτή τη διαδικασία επανατοποθετούνταν σε ένα βαθμιδωτής πυκνότητας διάλυμα χλωριούχου Καισίου 20%-50% και επαναλαμβάνονταν η φυγοκέντρηση για 15 ώρες σε 250.000g.

2.5. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.5.1. Φασματομετρική ανάλυση

Το φάσμα απορρόφησης των ιολογικών αιωρημάτων που έχουν υποστεί κάθαρση λαμβανόταν πλησίον της περιοχής της υπεριώδους ακτινοβολίας - U.V. - (220 με 320 nm) με τη βοήθεια φασματομέτρου διπλής δέσμης Beckman U.V. 5230. Οι υποδοχείς

που χρησιμοποιούνται ήταν από χαλαζία του 1cm οπτικού διαστήματος.

2.5.2. Χρωματομετρικές αναλύσεις

Χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι για το χαρακτηρισμό του νουκλεϊνικού οξέος.

-Το DNA προσδιορίστηκε με την αντίδραση της διφαινυλαμίνης κατά τη μέθοδο του DISCHE (1930) όπως τροποποιήθηκε από τους GILES and MYERS (1965).

-Το RNA προσδιορίστηκε από την αντίδραση ορκινόλης κατά την μέθοδο MEJBAUM (1939).

-Οι πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν με την αντίδραση του Folin κατά την μέθοδο των LOWRY et al. (1951) όπως τροποποιήθηκε από τον HARTREE (1972).

-Η οπτική πυκνότητα των διαλυμάτων μετρήθηκε σε φασματόμετρο Beckman D.K. 2A.

2.5.3. Ηλεκτροφόρηση γονιδιώματος σε πήγμα πολυακρυλαμίδης

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του LAEMMLI (1970) προσαρμοσμένη για τα διπλονηματικά τμήματα RNA. Αυτή περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

Το νουκλεϊνικό οξύ απελευθερώνεται από το ιολογικό αιώρημα που έχει υποστεί κάθαρση αφού το καψίδιο δεχθεί την επίδραση της πρωτεΐνης K(0,1 ml) και του sarkosyl (σαρκοζυλίου) (1,8% βάρος/βάρος) σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα TEN (Tris 0,01M, EDTA 0,004M, NaCl 0,1M σε pH 8,0). Μετά από επώαση 2 ωρών στους 37°C η αντίδραση διακόπτεται με ένα ανασταλτικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει κυανούν της βρωμοφαινόλης (0,005% και pH 6,8), χρώση που μας επιτρέπει να παρακολουθήσουμε τη μετανάστευση των πρωτεϊνών.

Το λαμβανόμενο αιώρημα κατόπιν τοποθετείται επάνω σε πήγμα πολυακρυλαμίδης συμπύκνωσης 5%, η δε μετανάστευση των πρωτεϊνών γίνεται σε πήγμα πολυακρυλαμίδης 7%.

Μετά από προ-ηλεκτροφόρηση για 30 min τοποθετούνται τα δείγματα, και η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε τάση 120 Volt, για 14-16 ώρες μέσα σε δοχείο Biorad που ψύχεται στους 4°C.

Για να εμφανισθούν οι θέσεις του νουκλεϊνικού οξέος, τα πηγματα υφίστανται χρώση με βρωμιούχο εθίδιον (ethidium bromide). Αυτό παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων δύο μικρών ινών του νουκλεϊνικού οξέος κατά τον σχηματισμό διπλής έλικας. Η εντόπιση των θέσεων γίνεται με έκθεση των πηγμάτων σε υπεριώδες φώς. Το χρωματισμένο νουκλεϊνικό οξύ εκπέμπει κίτρινο - πορτοκαλόχρουν φθορισμό. Τα χρωματισμένα πηγματα φωτογραφίζονται με φωτογραφική μηχανή Polaroid.

3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρώτες εργασίες που αναφέρονται σε ασθένειες εντόμων εμφανίζονται το δεύτερο μισό του 19ου αιώνα (ROBINET 1848, GOURDON 1852, PASTEUR 1870) και από τότε στον τομέα αυτό υπάρχει μία συνεχής εξέλιξη. Η εντομοπαθολογική έρευνα μέσα από αυτή την εξελικτική πορεία φτάνει στο επίπεδο όπου τα αίτια των ασθενειών μελετώνται, συσχετίζονται και αξιοποιούνται σε επιδημιολογικές μελέτες πληθυσμών των εντόμων και γίνεται προσπάθεια τα στοιχεία αυτά να χρησιμοποιηθούν προς όφελος του ανθρώπου. Έτσι αφού απομονώνονται τα παθογόνα αίτια, μελετώνται, αναπαράγονται τεχνητά και επιχειρείται η χρησιμοποίησή τους σε εμπορική κλίμακα για καταπολεμήσεις εντόμων. Ορισμένα από αυτά ήδη έχουν πάρει έγκριση εμπορικής κυκλοφορίας στην Ευρώπη (Mc Donald, 1991) και ο αριθμός των υπό έγκριση "βιοεντομοκτόνων" συνεχώς αυξάνεται.

Στα νεώτερα χρόνια η εντομοπαθολογία ακολουθεί την ανάπτυξη των υπολοίπων βιολογικών, μικροβιολογικών, βιοχημικών και βιοτεχνολογικών κλάδων. Έτσι δίνεται η δυνατότητα επακριβούς προσδιορισμού των παθογόνων στοιχείων με τη βελτιωμένη οπτική παρατήρηση των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων, με εξελιγμένα οπτικά και ηλεκτρονικά μικροσκόπια. Δίνεται η δυνατότητα απομόνωσης, διαχωρισμού, καθαρισμού και ακριβών μετρήσεων των βιοφυσικών ιδιοτήτων με την τελειοποίηση των εργαστηριακών οργάνων. Εξετάζεται σε όλα τα επίπεδα η σύνθεση της μοριακής δομής με τη βοήθεια χημικών και βιοχημικών αναλύσεων. Μελετάται η αντίδραση του προσβαλλόμενου οργανισμού μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος του και η δυνατότητα προσδιορισμού όλων των ορολογικών του αντιδράσεων με διάφορους τύπους ηλεκτροφορήσεων. Εφαρμόζονται τεχνικές καλλιέργειας ιστών *in vitro* ή καταλλήλων θρεπτικών υποστρωμάτων, ώστε να αντικατασταθεί ο απαραίτητος ξενιστής για τον τεχνητό πολλαπλασιασμό των παθογόνων. Τέλος επιχειρείται επέμβαση στον γενετικό κώδικα παθογόνων και ξενιστών μέσω της γενετικής μηχανικής ώστε να προσδοθούν επιθυμητές ιδιότητες είτε στα παθογόνα είτε στους ξενιστές και να επιτευχθούν στελέχη υψηλών δυνατοτήτων.

Στην παρούσα μελέτη των ιώσεων του δάκου της ελιάς οι εργασίες έγιναν στα πλαίσια των εργαστηριακών δυνατοτήτων και του διαθέσιμου τεχνολογικού εξοπλισμού. Στο μέρος αυτό γίνεται η παρουσίαση των φυσικών και πειραματικών ιολογικών μολύνσεων στο έντομο, ο τρόπος εντοπισμού και η ανακάλυψη ιών σε φυσικούς πληθυσμούς του δάκου, οι πειραματικές μολύνσεις που έγιναν, η

μελέτη της παθογένεσης των ιών μετά από φυσική ή τεχνητή μόλυνση σε επίπεδο υπερμικροσκοπικής δομής με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και τέλος εξετάζεται η δομή, οι βιοφυσικές και βιοχημικές ιδιότητες του ιού τύπου Reovirus με τη χρήση τεχνικών καθαρισμού δια φυγοκεντρήσεων, ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, φασματομετρικής ανάλυσης, και βιοχημικών αναλύσεων ως προς τη φύση του νουκλεϊνικού οξέος και ως προς την ηλεκτροφοριστική ανάλυση του γονιδιώματος του.

3.1. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΕΝΟΣ ΙΟΥ ΤΥΠΟΥ REOVIRUS ΣΤΟ ΔΑΚΟ

3.1.1. Εισαγωγή

Η εργασία αυτή ξεκίνησε με σκοπό να γίνουν πειραματικές μολύνσεις με γνωστούς ιούς άλλων εντόμων, στο δάκο της ελιάς, για να ελεγχθεί η παθογένεια στο έντομο αυτό. Κατά τη διάρκεια της εξέτασης των μολυνθέντων δάκων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκαν και ιοί διαφορετικής μορφολογίας από εκείνους που χρησιμοποιήθηκαν. Η παρατήρηση αυτή είναι η πρώτη που αναφέρεται στο δάκο της ελιάς (ANAGNOU, 1980, 1981, 1983, 1984 BERGOIN et al., 1983).

Μετά την παρατήρηση αυτή αναλήφθηκε προσπάθεια απομόνωσης, χαρακτηρισμού και μελέτη της παθογένειας των ιών αυτών. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται παρακάτω.

3.2.2. Υλικά και μέθοδοι

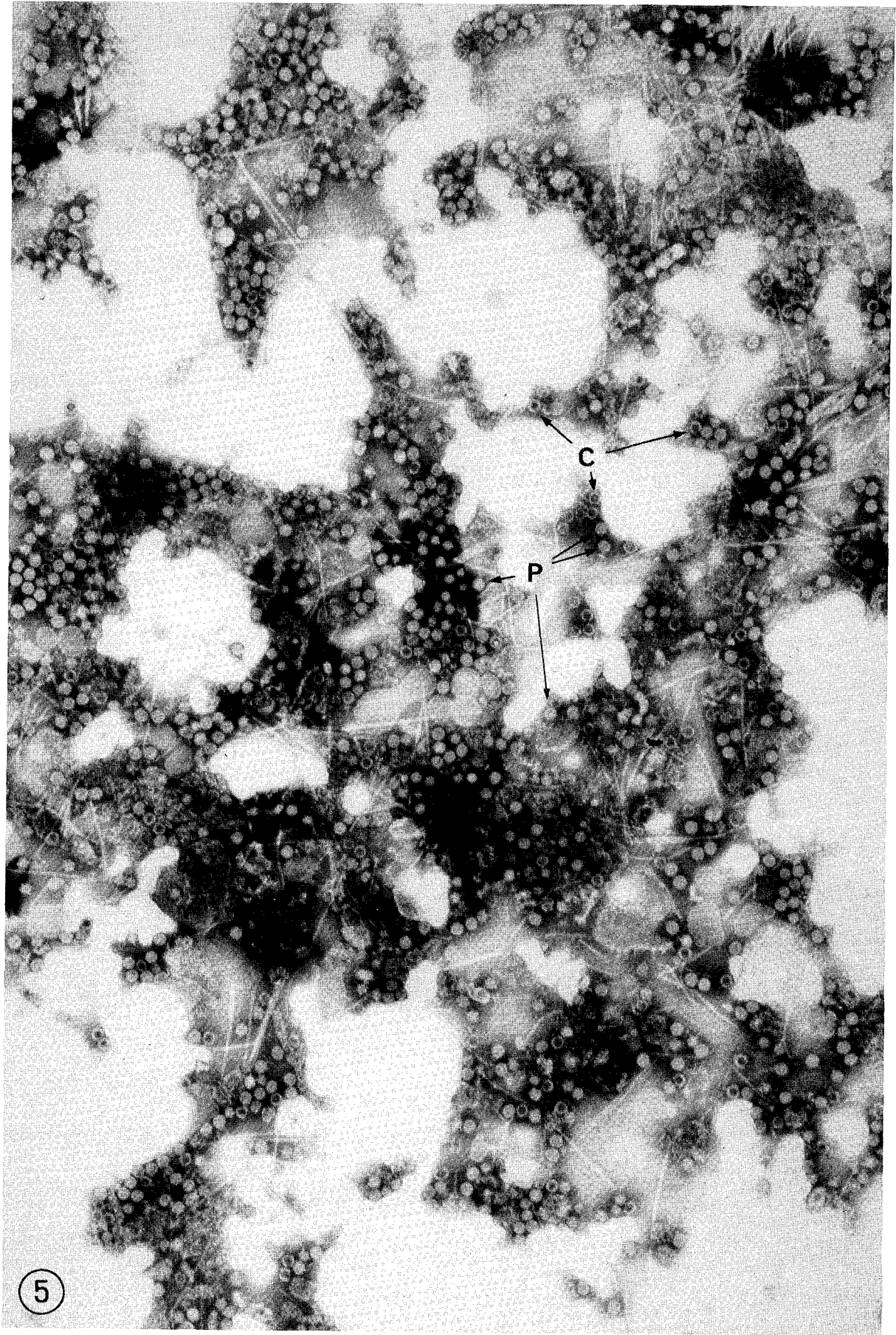
Χρησιμοποιήθηκαν ακμαία άτομα πληθυσμών του δάκου της ελιάς που προέρχονταν στη μεν πρώτη φάση της εργασίας από ελαιόκαρπου που συλλέχθηκε από ελαιώνα της περιοχής Καρύστου Ευβοίας, στη δε δεύτερη από ελαιώνα της κοινότητας Μαραθώνα Αττικής. Ο χειρισμός του ελαιοκάρπου και η εκτροφή των δάκων έγινε όπως περιγράφεται στο 2.1.2.

Στα ακμαία άτομα του δάκου έγιναν πειραματικές μολύνσεις με διάφορους ιούς με τη μέθοδο της έγχυσης όπως αναφέρεται στο 2.2.1.3. Τα νεκρά έντομα που λήφθηκαν λειοτριβήθηκαν και ο πολτός τους εξετάστηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στο 2.3.2.1.



EIKONA 5

Εικ. 5. Φωτογραφία σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετά από αρνητική χρώση λειοτριβημένου πολτού εντόμων δάκου της περιοχής Καρύστου. Κενά (C) και γεμάτα (P) ιολογικά σωματίδια διαμέτρου 60 nm με μορφολογικά χαρακτηριστικά των Reovirus.
x 41.500



3.2.3. Αποτελέσματα

Η εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του πολτού νεκρών μολυνθέντων εντόμων που προέρχονταν από την περιοχή της Καρύστου έδειξε ότι στα παρασκευάσματα παρατηρούντο και άλλα σωματίδια ιολογικής φύσεως, διαφορετικά των ιολογικών αιωρημάτων που είχαν χρησιμοποιηθεί στις μολύνσεις με έγχυση. Το πείραμα επαναλήφθηκε για τον έλεγχο τυχόν πειραματικού λάθους ή τυχαίων επιμολύνσεων. Τα αποτελέσματα της δεύτερης δοκιμής επιβεβαίωσαν την πρώτη παρατήρηση.

Η παρατήρηση σωματιδίων ιολογικής φύσεως, διαφορετικών εκείνων που εμβολιάστηκαν, οδήγησε στην εξέταση λειοτριβημένου πολτού εντόμων της ίδιας προέλευσης, που δεν είχαν όμως μολυνθεί πειραματικά. Με την εξέταση αυτή, πιστοποιήθηκε η ύπαρξη ιολογικών σωματιδίων στα διάφορα δείγματα.

Αιώρημα των σωματιδίων που λήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση, εμβολιάστηκε με την τεχνική της έγχυσης, σε πληθυσμό εντόμων που προέρχονταν από την περιοχή του Μαραθώνα Αττικής. Προηγουμένως εξετάστηκε μία σειρά δειγμάτων πολτού των εντόμων αυτών και δεν παρατηρήθηκαν ιολογικά σωματίδια αυτού ή άλλου τύπου. Μετά μερικές ημέρες από την μόλυνση τα έντομα εμφάνισαν θνησιμότητα σε σχέση με το μάρτυρα, ο οποίος είχε έντομα εμβολιασμένα με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer. Η θνησιμότητα αυτή, που θα παρουσιαστεί με αριθμητικά μεγέθη στις πειραματικές μολύνσεις σε άλλη ενότητα, δείχνει ότι το μόλυσμα παρουσιάζει παθογόνους ιδιότητες.

Η πρώτη παρατήρηση των ιολογικών σωματιδίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ότι επρόκειτο για έναν ιό σχήματος παρασφαιρικού. Ο ιός αυτός είχε διάμετρο 60nm (Εικ. 5) και παρουσίαζε μορφολογικά χαρακτηριστικά ενός Reovirus. Λεπτομερής περιγραφή του ιού θα γίνει σε παρακάτω ενότητα.

3.2. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

3.2.1. Εισαγωγή

Οι παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρασφαιρικών ιολογικών σωματιδίων διαμέτρου 60nm στον πολτό εντόμων που προέρχονταν από την περιοχή Καρύστου είναι η πρώτη παρατήρηση ιού στο δάκο. Το γεγονός αυτό προέτρεψε στο να μελετηθεί η

ύπαρξη και η συχνότητα εμφάνισης των ιών αυτών στους πληθυσμούς του δάκου καθώς και η επίδραση που μπορεί να έχει η παρουσία τους στη δυναμική των πληθυσμών του. Ακόμη στα εξεταζόμενα δείγματα διαπιστώθηκε η ύπαρξη 2 ειδών ιολογικών σωματιδίων.

3.2.2. Υλικά και μέθοδοι

Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες προσβεβλημένου ελαιοκάρπου από 22 περιοχές της Ελλάδος: Στην Αττική από Κηφισιά, Μαραθώνα, Κρουονέρι, Αχαρνές, στην Αργολίδα από Ιρία, Παλαιά Επίδαυρο, Τολό, στη Βοιωτία από Τανάγρα, Ξηρονομή, Μάζι, στην Κέρκυρα από τη Λευκίμη, στην Κορινθία από Καμάρι και Κιάτο, στην Κρήτη από τα Χανιά κοντά στη Χρυσοπηγή, από τον Αλικιανό καθώς και έξω από την πόλη του Ρεθύμνου, στην Εύβοια από Ροβιές και Κάρυστο, στη Μαγνησία από τους πρόποδες του Πηλίου, στη Φωκίδα από το Λιδωρίκι, στη Φθιώτιδα από το Γοργοπόταμο και στη Σάμο από το Πυθαγόρειο.

Η δειγματοληψία του προσβεβλημένου ελαιοκάρπου γινόταν από 3 τουλάχιστον δένδρα και κάθε δείγμα αποτελείτο από τουλάχιστον 300 ελιές. Ο χειρισμός του ελαιοκάρπου γινόταν όπως περιγράφεται στο 2.1.2. Από τα ακμαία έντομα λαμβάνονταν 100 άτομα που λειοτριβούνταν, το αιώρημά τους διαυγάζονταν και από κάθε αιώρημα εξετάζονταν 3 παρασκευάσματα ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στο 2.3.2.1 για να διαπιστωθεί η παρουσία ιών.

3.2.3. Αποτελέσματα

3.2.3.1. Ανεύρεση Reo-ιών σε φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου

Από την εξέταση του λειοτριβημένου πολτού των εντόμων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έγινε εμφανής η παρουσία των ιών τύπου Reovirus σε δείγματα 8 τοποθεσιών από τις 22. Πρόκειται για πληθυσμούς που προέρχονται από Αχαρνές, Ιρία, Τολό, Καμάρι, Κάρυστο, Πήλιο, Λιδωρίκι, Πυθαγόρειο. Σε δύο περιοχές, Τολό και Πήλιο τα σωματίδια εμφανίζονταν κενά, είχαν όμως το ίδιο μέγεθος και σχήμα.

Από τη γεωγραφική κατανομή των δειγμάτων φαίνεται ότι η ύπαρξη Reo-ιών ανιχνεύεται σε πληθυσμούς που προέρχονται από διάφορες περιοχές απομακρυσμένες μεταξύ τους τόσο από την ηπειρωτική όσο και τη νησιωτική χώρα, πράγμα που δείχνει μία ευρεία κατανομή της μόλυνσης (Εικ. 6). Η απουσία ιών από

EIKONA 6

Εικ. 6. Βιότοποι όπου πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες δάκου για έλεγχο παρουσίας ιώσεων

- Παρουσία ιών τύπου Reovirus (60nm διαμέτρου)
- ⊛ Παρουσία ιών 40nm διαμέτρου
- ⊙ Παρουσία ιών 30nm διαμέτρου
- Δεν παρατηρήθηκαν ιολογικά σωματίδια



6

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ

Περιοχές δειγματοληψιών και αποτελέσματα ανίχνευσης ιών σε παρασκευάσματα που παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

	<u>Περιοχές</u>	<u>Reovirus</u>	<u>Μικροί ιοί</u>	
			<u>(40nm)</u>	<u>(30nm)</u>
ΑΤΤΙΚΗ	1) Κηφισιά	-	-	-
	2) Μαραθών	-	-	-
	3) Κρυονέρι	-	-	-
	4) Αχαρνές	+	-	-
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	5) Ιρία	+	-	-
	6) Π. Επίδαυρος	-	-	-
	7) Τολό	Σωματίδια κενά	+	-
ΒΟΙΩΤΙΑ	8) Τανάγρα	-	-	-
	9) Ξηρονομή	-	-	-
	10) Μάζι	-	+	-
ΚΕΡΚΥΡΑ	11) Λευκίμη	-	-	+
ΚΟΡΙΝΘΙΑ	12) Καμάρι	+	-	-
	13) Κιάτο	-	-	-
ΚΡΗΤΗ	14) Χανιά (Χρυσοπηγή)	-	-	-
	15) Ρέθυμνο	-	-	-
	16) Αλικιανός	-	+	-
ΕΥΒΟΙΑ	17) Ροβιές	-	-	-
	18) Κάρυστος	+	-	-
ΜΑΓΝΗΣΙΑ	19) Πήλιο	Σωματίδια κενά	+	-
ΦΩΚΙΑ	20) Λιδωρίκι	+	-	-
ΦΘΙΩΤΙΔΑ	21) Γοργοπόταμος	-	-	-
ΣΑΜΟΣ	22) Πυθαγόρειον	+	+	+
		-----	-----	-----
		8	5	2

τα δείγματα δεν σημαίνει απαραίτητα και την απουσία τους από τον πληθυσμό, αλλά ότι ο πληθυσμός των μολυσμένων ακμαίων μπορεί να βρίσκεται σε μικρή πυκνότητα σε σχέση με τα εξεταζόμενα δείγματα.

Συσχέτιση μεταξύ των περιοχών που βρέθηκαν ιολογικά σωματίδια και των περιοχών υψηλής και χαμηλής πληθυσμιακής πυκνότητας δεν έγινε κατορθωτή διότι υπεισέρχονταν διάφοροι παράγοντες όπως ψεκασμοί, ποικιλία, παραγωγή, κλιματολογικές και γεωγραφικές συνθήκες καθώς και άλλοι παράμετροι που επηρεάζουν τους πληθυσμούς ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη ιολογικών σωματιδίων.

3.2.3.2. Παρουσίαση δύο άλλων μικρών ιών στους φυσικούς πληθυσμούς.

Κατά την διάρκεια της εξετάσεως των δειγμάτων που αφορούσε την έρευνα του Reovirus στους φυσικούς πληθυσμούς του δάκου, διαπιστώθηκε η ύπαρξη 2 ακόμη τύπων ιολογικών παρασφαιρικών σωματιδίων.

Τα παρασφαιρικά αυτά σωματίδια βρέθηκαν στον ποτό των εντόμων που προέρχονταν από τις περιοχές Τολό, Μάζι, Αλικιανός, Πήλιο και Πυθαγόρειο. Τα συνοπτικά αποτελέσματα από την εξέταση αυτών των δειγμάτων φαίνονται στον Πίνακα II ενώ στην Εικ. 6 φαίνεται η γεωγραφική κατανομή τους.

Ο ένας από τους δύο αυτούς τύπους ιών έχει μέγεθος που ξεπερνά 40nm και παρουσιάζει δομή πολύ διαφορετική από αυτή του Reovirus (Εικ. 7 και 8). Το μεγαλύτερο ποσοστό των σωματιδίων αυτών ήταν κενά ή διέθεταν μία φωτεινή κεντρική ζώνη. Αυτά τα ιολογικά σωματίδια που βρέθηκαν σε δείγματα 5 τοποθεσιών απαντώνται μόνο τους (Μάζι, Αλικιανός) ή συνυπάρχουν με τους Reovirus.

Ο άλλος τύπος από τους μικρούς αυτούς ιούς βρισκόταν άλλοτε μόνος του (Λευκίμη) και άλλοτε σε συνύπαρξη με τους άλλους δύο τύπους (Πυθαγόρειο). Τα σωματίδια αυτά ήταν μικρότερα των προηγούμενων, είχαν διάμετρο 30nm και παρουσιάζονταν γενικά σε σχηματισμό γεμάτων σωματιδίων. Από το μέγεθος και την μορφή του ο ιός αυτός μπορεί να χαρακτηριστεί ως Picornavirus. (Εικ. 8).

3.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

3.3. Εισαγωγή

Για να εξακριβωθεί η μολυσιακή ικανότητα των ιών στο δάκο της ελίας επιχειρήθηκαν πειραματικές μολύνσεις. Σκοπό είχαν την αναπαραγωγή της παθογένειας ώστε τα αποτελέσματα να χαρακτηρίσουν τη σχέση του παθογόνου με τον ξενιστή, απομονώνοντας το έντομο από τις άλλες παραμέτρους που υπάρχουν στη φύση.

Οι πειραματικές μολύνσεις αφορούσαν τον έλεγχο της παθογόνου δύναμης των ιών τύπου Reovirus καθώς και άλλων γνωστών ιών που είχαν απομονωθεί από έντομα και οι οποίοι παρασχέθηκαν από τα Εργαστήρια του Station de Recherches de Pathologie Comparee της Γαλλίας.

3.3.1. Πειραματικές μολύνσεις με ιούς τύπου Reovirus

Πραγματοποιήθηκαν δύο τύποι πειραματικών μολύνσεων, *per os* και με ενδοαιμοκοιλιακή έγχυση στη γενική κοιλότητα του εντόμου.

Η πρώτη περίπτωση αφορούσε στην εξακρίβωση της ικανότητας των ιών να προσβάλλουν τα ακμαία του δάκου δια της στοματικής οδού και να εκτιμηθεί η δυνατότητα να μεταδοθεί ο ιός τεχνητά με τη δημιουργία εστιών μόλυνσης στους βιότοπους που κυκλοφορεί ο δάκος. Στην δεύτερη περίπτωση αντίθετα επιχειρήθηκε να εκτιμηθεί η παθογόνος δύναμη των ιών, όταν εισέρχονταν κατ' ευθείαν στο εσωτερικό του εντόμου.

3.3.1.1. Μόλυνση *per os*

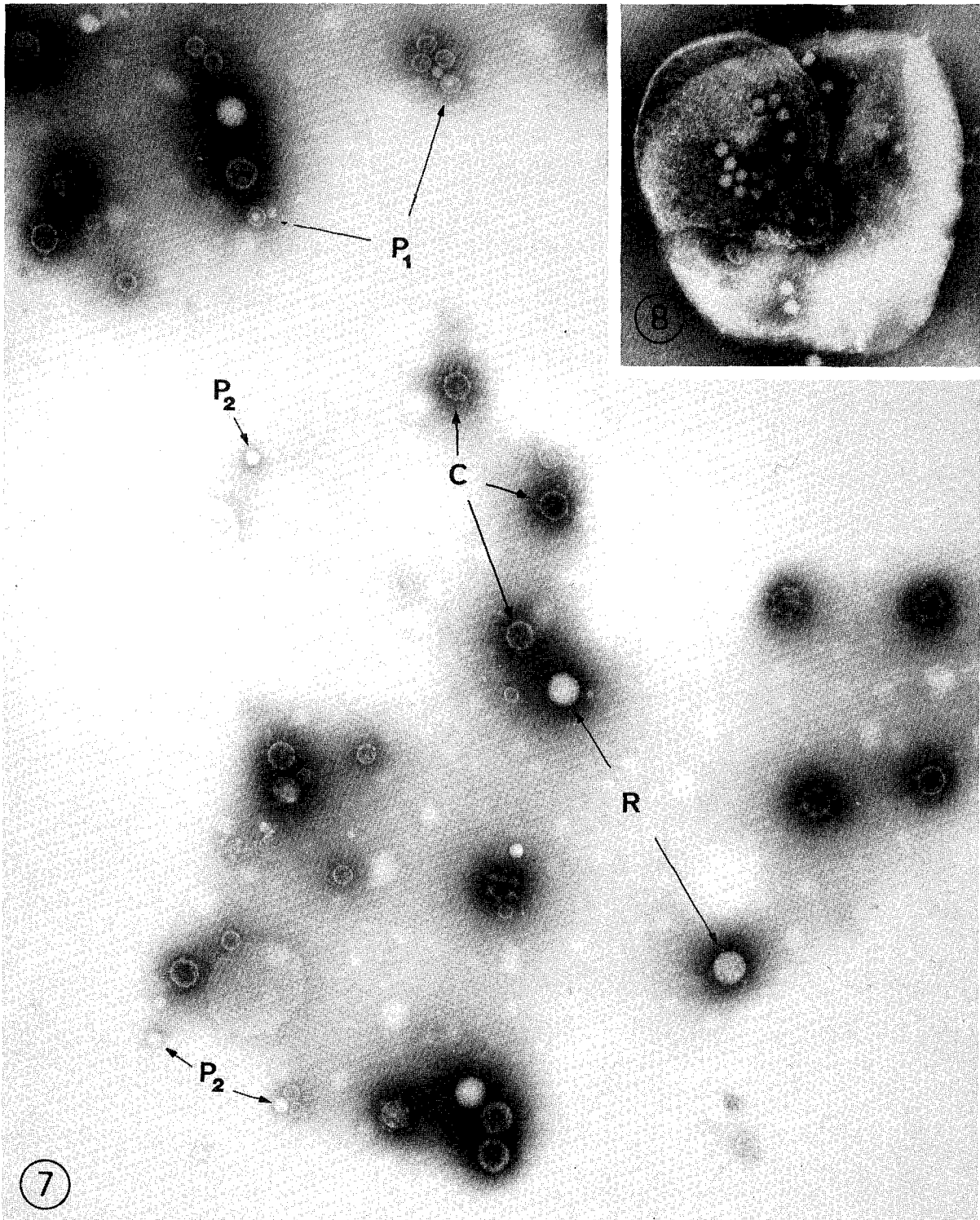
Για τις *per os* μολύνσεις των τελείων εντόμων χρησιμοποιήθηκαν ιοί, σε σακχαρικό διάλυμα 50%, που είχαν υποστεί καθαρισμό και έλεγχο στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (2.2.1.2.)

Το διάλυμα δινόταν σε μικρές σταγόνες επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, μέσα σε κλωβούς που περιείχαν 30 ακμαία δάκου. Η μολυσμένη τροφή παρέχόταν 3 συνεχείς ημέρες, ενώ στη

EIKONA 7

- Εικ. 7. Εξέταση με την τεχνική της αρνητικής χρώσης λειοτριβημένου πολτού εντόμων από πληθυσμό του *δάκου* που προερχόταν από τη νήσο Σάμο. Διακρίνονται σε αυτό το πλάνο οι τρεις τύποι των ιολογικών σωματιδίων.
- Τα σωματίδια του Reovirus, που είναι πλήρη (R) ή αποδομημένα (C).
 - Οι μικροί παρασφαιρικοί ιοί διαμέτρου 40nm (P₁) οι οποίοι παρουσιάζονται ως κενά σωματίδια ή φέρουν μία κεντρική κηλίδα.
 - Μικροί παρασφαιρικοί ιοί διαμέτρου 30nm (P₂).
- x 91.500

- Εικ. 8. Ιολογικά σωματίδια διαμέτρου 30nm, όμοια με εκείνα των Picornavirus.
- x 91.500

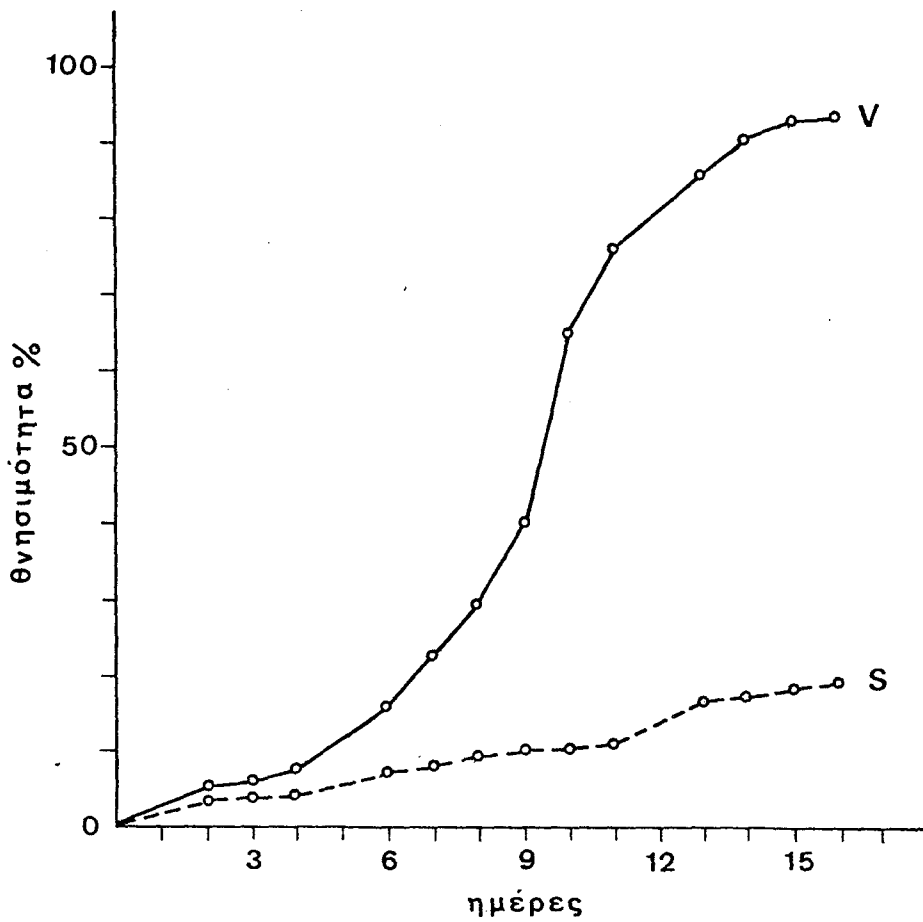


EIKONA 9

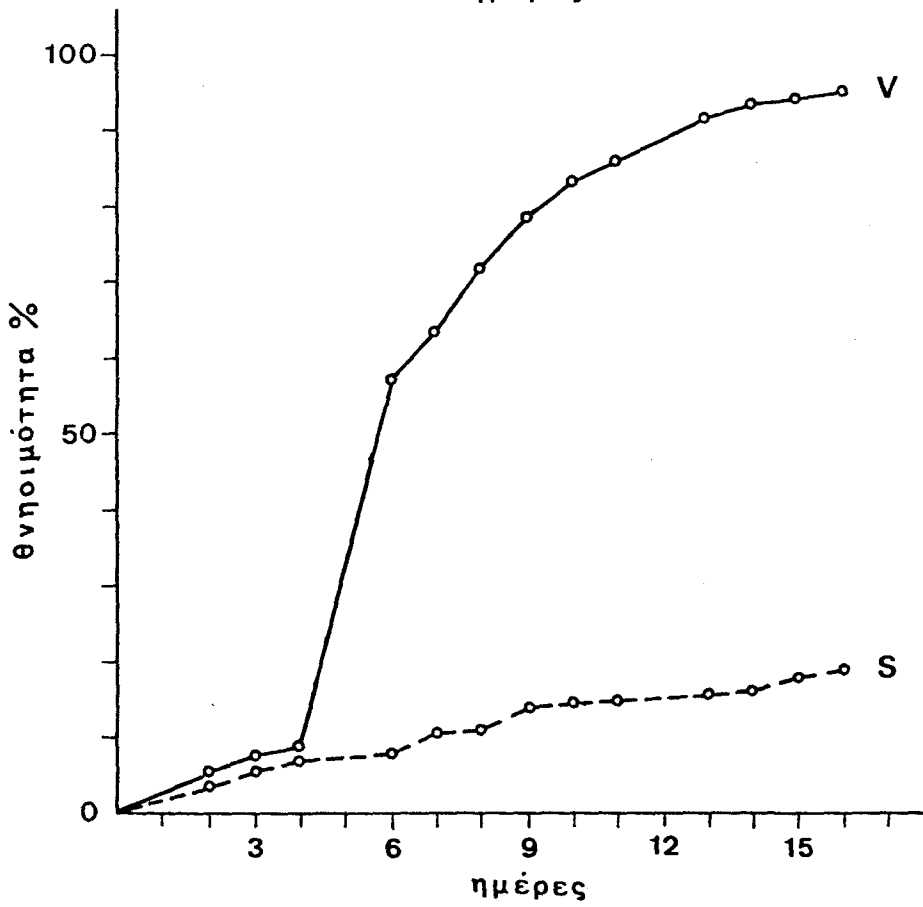
Εικ. 9. Αθροιστικές καμπύλες θνησιμότητας τελείων δάκου στα οποία χορηγήθηκε επί 3 ημέρες σακχαρούχο διάλυμα μολυσμένο με *reovirus* και διάλυμα χωρίς μόλυσμα
S: Επαναλήψεις μάρτυρα. Αμόλυντα έντομα
V: Επαναλήψεις μολυνθέντων εντόμων με ιούς

Εικ. 91. Αθροιστικές καμπύλες θνησιμότητας νεαρών ακμαίων ατόμων του δάκου μολυνθέντων με έγχυση.
S: Επαναλήψεις μάρτυρα. Εμβολιασμένα με Ringer έντομα.
V: Επαναλήψεις μολυνθέντων. Εμβολιασμένα με ιούς έντομα

9



9¹



συνέχεια χορηγείτο καθαρό σακχαρικό διάλυμα. Έτσι μολύνθηκαν 150 ακμαία, σε 5 κλωβούς, ενώ άλλα 150 αποτελούσαν το μάρτυρα στον οποίο παρέχόταν μόνο διάλυμα σάκχαρης.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους $25^{\circ}(\pm 1)^{\circ}\text{C}$, σχετική υγρασία 65-70% και φωτοπερίοδο 18h το 24ωρο. Η ποσότητα μολυσμένης τροφής που καταναλώθηκε από κάθε άτομο δεν μετρήθηκε λόγω του εξαιρετικά μικρού βάρους της και έτσι δεν έγινε ακριβής βιολογική δοσομέτρηση.

Η διάρκεια του πειράματος ήταν 16 ημέρες και καταγραφόταν η θνησιμότητα κάθε μέρα. Η παρουσία ιών στα νεκρά άτομα ελεγχόταν με εξέταση του λειοτριβημένου πολτού των εντόμων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, με βάση τις τεχνικές που έχουν περιγραφεί στο 2.3.2.1. Επίσης από τα τοιχώματα των κλωβών λαμβάνονταν με ενυδάτωση αποχωρήματα και ελέγχονταν για την ύπαρξη ιών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

3.3.2.2. Μόλυνση με έγχυση

Για τις μολύνσεις με έγχυση ιολογικού διαλύματος στη γενική κοιλότητα του εντόμου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα μικροεγχυτή (L' HERITIER, 1952) που περιγράφεται στο 2.2.1.3.

Στα υπό μόλυνση έντομα έγινε έγχυση ιολογικού αιωρήματος, που είχε υποστεί καθαρισμό όπως αναφέρεται στο 2.2.1.1. ενώ στα άτομα που χρησίμευαν ως μάρτυρες έγινε έγχυση φυσιολογικού ορού εντόμων (Ringer).

Για τη μέθοδο αυτή μόλυνσης του δάκου χρησιμοποιήθηκαν 360 ακμαία, ενώ ίσος αριθμός αποτέλεσε το μάρτυρα.

3.3.2.3. Αποτελέσματα

Η αθροιστική θνησιμότητα που εμφάνισαν τα έντομα ανά ημέρα που μολύνθηκαν με το ιολογικό παρασκεύασμα *per os* και με έγχυση φαίνεται στην Εικ. 9.

Στην πρώτη περίπτωση η αθροιστική θνησιμότητα έφθασε μετά 16 ημέρες στο επίπεδο του 93%. Οι 5 κλωβοί περιείχαν 30 ακμαία ο κάθε ένας και η θνησιμότητα $t=16$ ημέρες ήταν $27,8 \pm 2,16$ έντομα ανά κλωβό. Το LT_{50} του πληθυσμού σε αυτή την περίπτωση υπολογίστηκε από το διάγραμμα ότι εμφανίζεται την 9η ημέρα. Μετά την ημέρα αυτή η θνησιμότητα αυξήθηκε πολύ και έφθασε το 90% 5 ημέρες αργότερα. Ο μάρτυρας για το ίδιο διάστημα των 16

ημερών παρουσίασε φυσιολογικά χαμηλή θνησιμότητα. Η αθροιστική θνησιμότητα του μάρτυρα σε $t=16$ ημέρες έφθανε μόλις το 18% ($5,2 \pm 3,11$ νεκρά κατά κλωβό). Η εξέταση του λειοτριβημένου πολτού των νεκρών εντόμων από τις επαναλήψεις του μάρτυρα ήταν για όλα αρνητική ως προς τους ιούς, ενώ για εκείνα που είχαν μολυνθεί ήταν θετική. Επίσης θετική ήταν και η εξέταση των αποχωρημάτων τους.

Στη δεύτερη περίπτωση της μόλυνσης των εντόμων με έγχυση, τοποθετήθηκαν 4 κλωβοί με 90 ακμαία ανά κλωβό και ισάριθμοι ως μάρτυρες. Εμφανίστηκε μία χαμηλή θνησιμότητα την πρώτη και κατά την έναρξη της δεύτερης ημέρας και στο μάρτυρα και στην επέμβαση, που αποδόθηκε σε τραυματισμό των εντόμων από την ένεση και γι' αυτό δε λήφθηκε υπόψη. Από την 4η ημέρα, στα μολυσμένα έντομα παρατηρείται μία ταχεία αύξηση της θνησιμότητας και η LT_{50} εμφανίστηκε την 5η ημέρα. Το 90% της θνησιμότητας παρατηρήθηκε τη 12η ημέρα. Σε χρόνο $t=16$ ημέρες που σταμάτησε η καταμέτρηση, τα έντομα που είχαν δεχθεί το δεύτερο τύπο επέμβασης, η αθροιστική θνησιμότητα ανήλθε στο 97%. (μέσος όρος ανά κλωβό $87,2 \pm 2,23$ νεκρά έντομα). Παράλληλα στο μάρτυρα η θνησιμότητα ακολουθεί μία φυσιολογική αύξηση που φθάνει το 20% με $17,7 \pm 4,28$ άτομα νεκρά ανά κλωβό.

Η εξέταση των μολυσμένων εντόμων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε μεγάλο αριθμό ιολογικών σωματιδίων μετά την 5η ημέρα από τη μόλυνση. Οι ίδιες εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν και αφορούσαν το λειοτριβημένο πολτό εντόμων του μάρτυρα έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα ως προς την παρουσία ιολογικών σωματιδίων.

Συμπερασματικά αναφέρεται ότι η μόλυνση με τους ιούς αποδείχτηκε ισχυρά παθογόνος, διότι εμφάνισε μεγάλη διαφορά θνησιμότητας ως προς το μάρτυρα και στις δύο μεθόδους. Η μικρή αύξηση θνησιμότητας με τη μέθοδο της έγχυσης και για το μάρτυρα και την επέμβαση, δικαιολογείται ως επακόλουθο του τραυματικού χειρισμού των εντόμων. Ο μικρός αριθμός επιζώντων και για τους δύο χειρισμούς μπορεί να οφείλεται σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις ιολογικές μολύνσεις.

3.3.3. Πειραματικές μολύνσεις με άλλους εντομοπαθογόνους ιούς

3.3.3.1. Υλικά και μέθοδοι

Για να διαπιστωθεί η ενδεχόμενη παθογόνος ικανότητα ως προς το δάκο εντομοπαθογόνων ιών που ανήκουν σε διάφορες ταξινομικές ομάδες, με την προοπτική της χρησιμοποίησής τους για βιολογική καταπολέμηση του δάκου πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μολύνσεις στα έντομα με διάφορους τύπους γνωστών εντομοπαθογόνων ιών.

Για τις πειραματικές μολύνσεις προτιμήθηκε η μέθοδος της έγχυσης από την *per os* μέθοδο λόγω της ταχύτερης εμφάνισης των φαινομένων, της ταυτόχρονης μόλυνσης και της δυνατότητας ελέγχου της ποσότητας μολυσματικού εγχύματος.

Τα αιωρήματα των ιών που δοκιμάστηκαν παρασχέθηκαν από τα διάφορα Εργαστήρια του Station de Recherches de Pathologie Comparee της Γαλλίας. Η επιλογή τους έγινε κατά τρόπο ώστε να καλύπτονται οι κυριότεροι τύποι ιών που προσβάλλουν τα έντομα, τόσο όσον αφορά τη θέση που αναπαράγονται στα κύτταρα όσο και ως προς τις βασικές τους ιδιότητες (ριβοζονουκλεϊνικό οξύ που περιέχουν, σχηματισμός εγκλείστων σωματίων κ.λπ.).

Ετσι επιλέχθηκαν ιοί με DNA, με ενδοπυρηνικό πολλαπλασιασμό που σχηματίζουν εγκλείστα σωματίδια (Baculovirus) ή ελεύθεροι (Densovirus) ή ενδοκυτταρικής αναπαραγωγής (Iridovirus) και ιοί με RNA που αναπτύσσονται μέσα στο κυτταρόπλασμα (Reovirus και Picornavirus). Οι ιοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

-Baculovirus της πυρηνικής πολυέδρωσης του *Autographa californica* (Speyer) (Lepidoptera) (VAIL and al. 1973).

-Baculovirus της πυρηνικής πολυέδρωσης του *Tipula paludosa* Meigen (Diptera) (XEROS, 1954).

-Iridovirus του *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera) (FUKAYA and NASU, 1966).

-Densovirus του *Junonia coenia* Hubn. (Lepidoptera) (RIVER and LONGWORTH, 1972).

-Picornavirus του CrPV της παράλυσης των γρύλλων (*Teleogryllus oceanicus*, (Le Guillou) Orthoptera) (REINGANUM et al., 1970).

-Picornavirus C του *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera) (JOUSSET and al., 1972).

-Reovirus I του *Ceratitis capitata* Vied. (Diptera) (PLUS et al., 1981).

-Ιοί που δεν έχουν ταξινομηθεί του *C. capitata* (Diptera), (χορηγήθηκαν προσωπικά από το Dr G. MEYNADIER).

Σε όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν άνω των 100 ακμαίων δάκου κατά περίπτωση και για δύο περιπτώσεις που εμφανίστηκε έντονη θνησιμότητα επαναλήφθηκε το πείραμα με 200 ακμαία. Παράλληλα εγχύσεις γίνονταν με φυσιολογικό ορό εντόμων (Ringer) και σε έντομα που αποτέλεσαν το μάρτυρα.

3.3.2.2. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα των πειραματικών μολύνσεων συνοψίζονται όπως παρακάτω:

Ο Baculovirus της πυρηνικής πολυέδρωσης (NPV) του *A. californica*, που είναι ιός με ευρύτατο φάσμα μολυσματικής ικανότητας στα έντομα, ο Baculovirus της πυρηνικής πολυέδρωσης (NPV) του *T. paludosa*, που έχει όλα τα πλεονεκτήματα των βακιλοϊών και επί πλέον είναι παθογόνος σε δίπτερα και οι δύο μικρού μεγέθους ιοί που σχηματίζουν πυρηνικά πολύεδρα χωρίς κάλυμμα και είναι οι ιοί C του *D. melanogaster* και οι μη ταξινομημένοι ιοί του *C. capitata* συγγενούς είδους στο *D. oleae*, δεν εμφάνισαν μολυσματική ικανότητα και η θνησιμότητα εκυμαινέτο στα ίδια επίπεδα με το μάρτυρα, η οποία μετά 2 εβδομάδες δεν υπερέβαινε το 20%.

Αντίθετα οι υπόλοιποι ιοί ήταν παθογόνοι στο δάκο από τους οποίους οι δύο σε μεγάλο βαθμό. Πρόκειται για τον ιό CrPV, της παράλυσης των γρύλλων που είναι μικρός πολυεδρικός ιός τύπου Picornavirus. Ο ιός αυτός θανατώνει τους δάκους σε 3 ημέρες, όπως θανατώνει έναν άλλο ξενιστή, το *D. melanogaster* (JOUSSET, 1977, και σε αρκετές εργασίες που έγιναν στο St. de Recherches de Pathologie Comparee). Ο δεύτερος είναι ο Iridovirus του *C. suppressalis* ή αλλιώς CIV. Ο ιός αυτός χαρακτηρίζεται από έντονη αναπαραγωγή, και η κοιλία των εντόμων χρωματίζεται κυανή, χρώμα χαρακτηριστικό της συσσώρευσης βίριον που είναι διάχυτα λόγω της μόλυνσης μέσα στους ιστούς. Η κυανή αυτή χρώση στο δάκο γίνεται ορατή μετά 6 ημέρες και ακολουθεί ο θάνατος των εντόμων. Το ποσοστό της εκατοστιαίας θνησιμότητας των εντόμων, σε σχέση με το χρόνο, για τους δύο παραπάνω ιούς φαίνεται στην Εικόνα 10. Για τους άλλους ιούς, τον Densovirus του *J. coenia* μικρού πολυεδρικού ιού και του Reovirus I του *C. capitata* παρατηρήθηκε μία πρόωγη θνησιμότητα σε σχέση με το μάρτυρα. Δεν έγινε κατορθωτό να επαναληφθεί η δοκιμή λόγω έλλειψης μολύσματος.

Για τις τέσσερις αυτές περιπτώσεις των μολύνσεων η εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του λειοτριβημένου πολτού των νεκρών εντόμων αποκάλυψε πολυάριθμα ιολογικά σωματίδια που δημιουργήθηκαν από έντονο πολλαπλασιασμό των βίριον μέσα στους ιστούς των εντόμων και κυρίως για τους ιούς CrPV και CIV (Εικ. 11 και 12).

3.3.3. Συμπεράσματα

Οι πειραματικές μολύνσεις μας επέτρεψαν να προσδιορίσουμε την παθογόνο δύναμη που έχουν ορισμένοι ιοί στο δάκο της ελιάς.

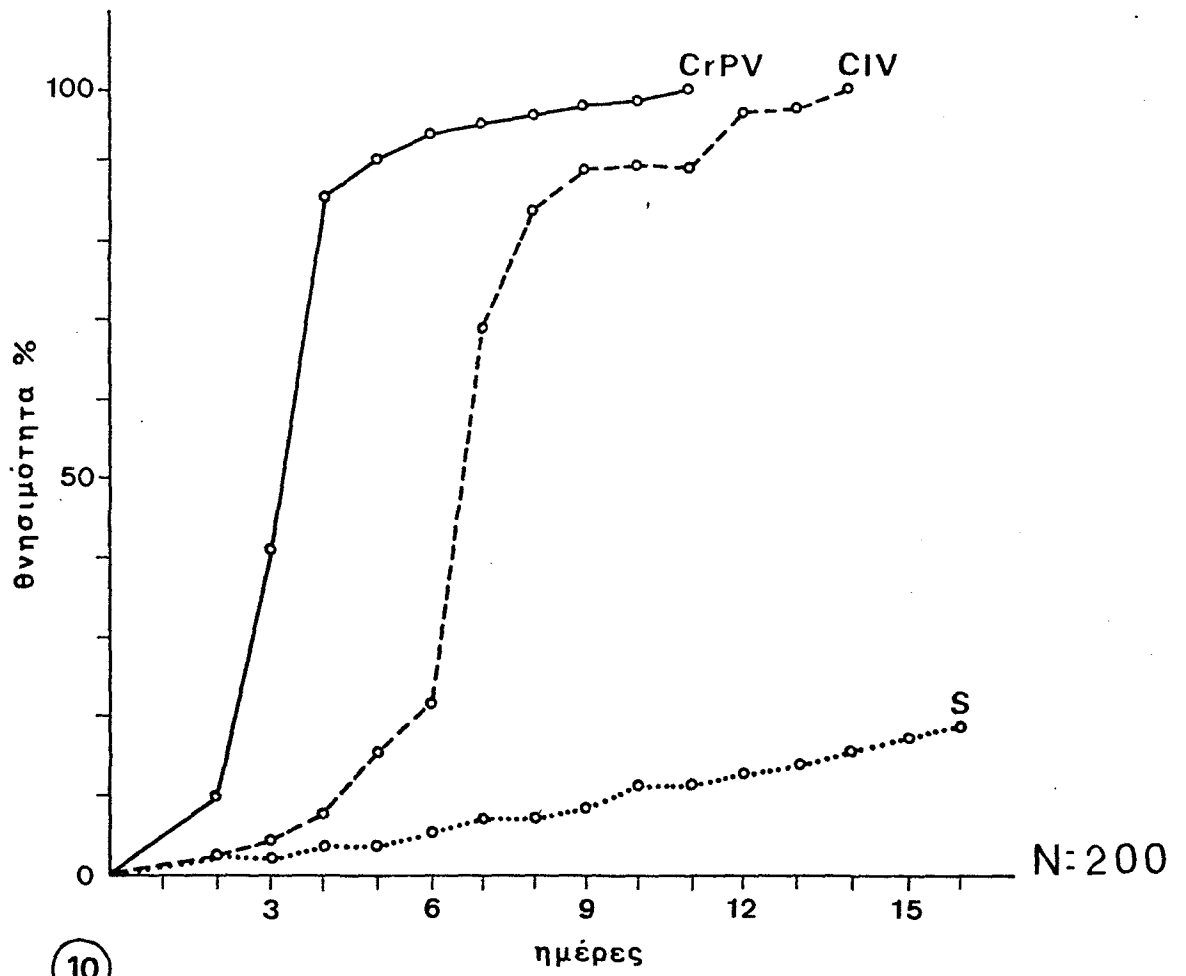
EIKONA 10

Εικ. 10. Αθροιστικές καμπύλες της θνησιμότητας νεαρών ακμαίων του δάκου μετά από πειραματικές μολύνσεις.

CrPV: Picornavirus της παράλυσης των γρύλλων
(Orthoptera).

CIV: Iridovirus του *Chilo suppressalis*
(Lepidoptera).

S: Ringer.

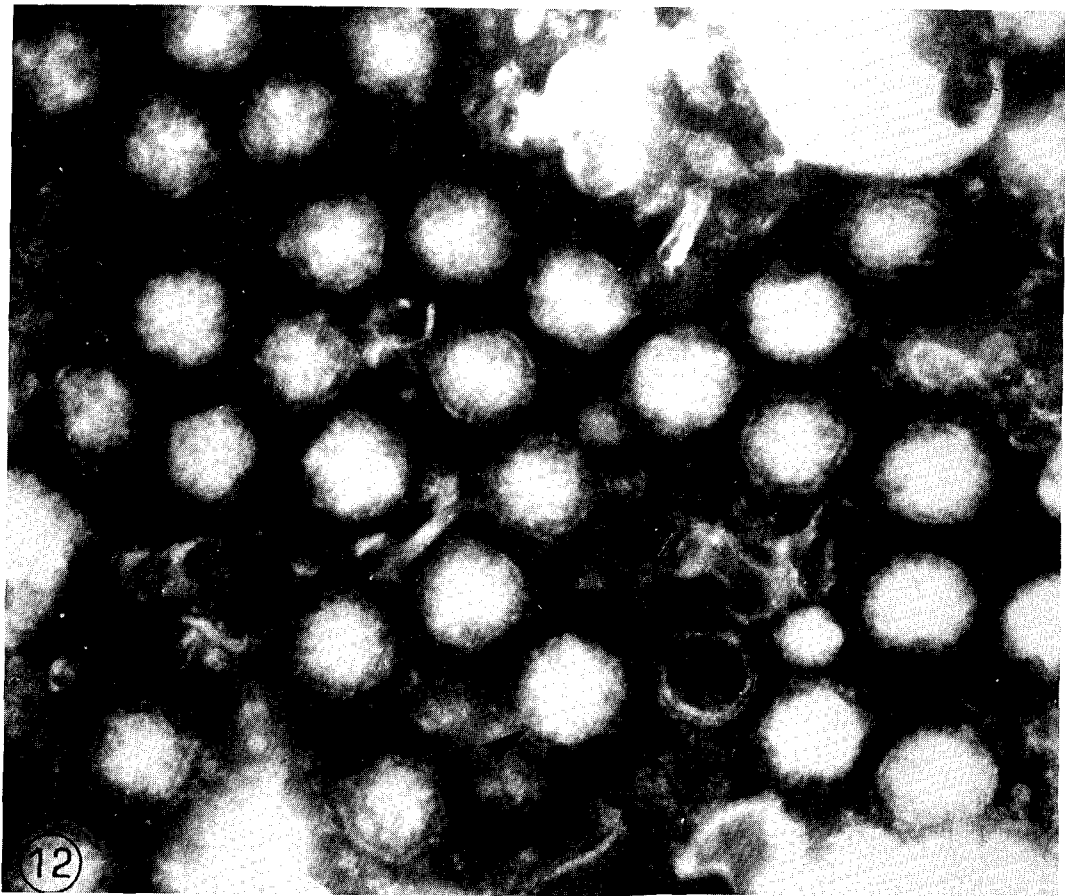
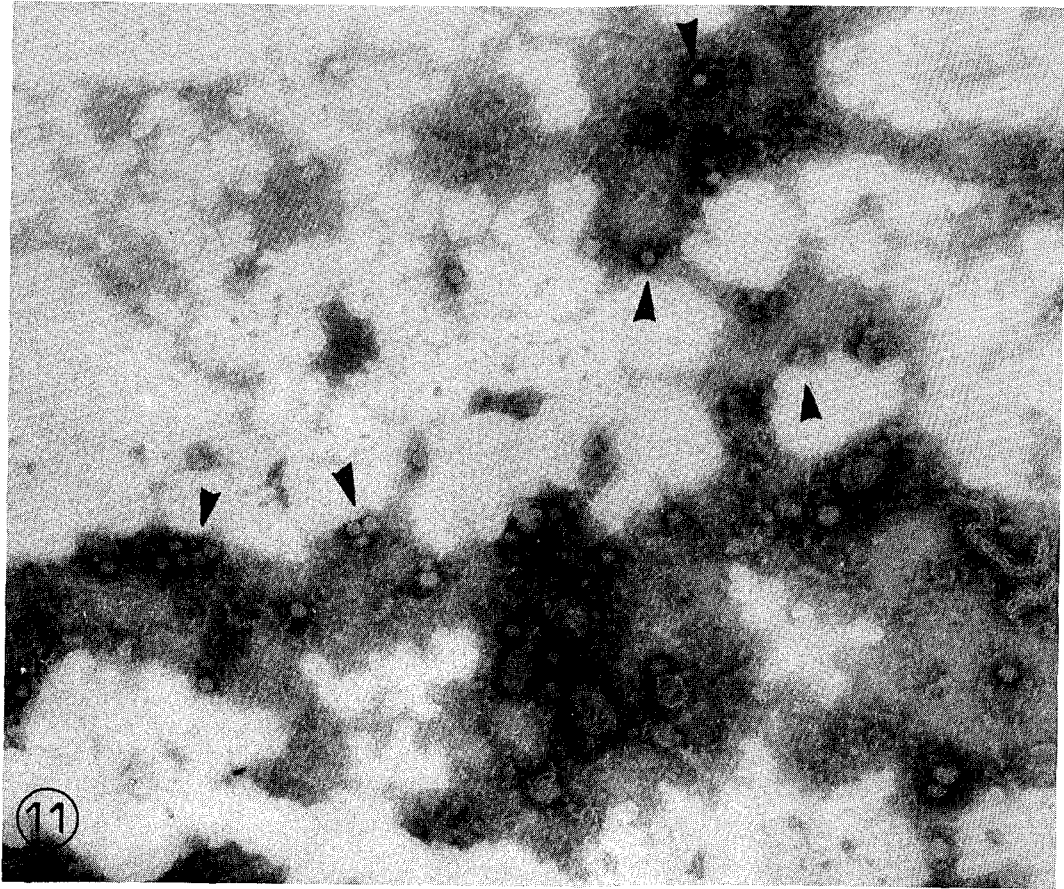


10

EIKONA 11

Εικ. 11. Εξέταση σε αρνητική χρώση λειοτριβημένου πολτού του δάκου μετά από μόλυνση με CrPV.
x 66.500

Εικ. 12. Εξέταση σε αρνητική χρώση λειοτριβημένου πολτού του δάκου μετά από μόλυνση με CIV.
x 66.500





Τα θετικά αποτελέσματα, που φάνηκαν με την καταμέτρηση της θνησιμότητας στους κλωβούς των μολυσμένων εντόμων σε σχέση με το μάρτυρα, καθώς και η επιβεβαίωση της αιτίας του θανάτου με την παρατήρηση του λειοτριβημένου πολτού των εντόμων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, δείχνουν ότι ο δάκος της ελιάς είναι ευαίσθητος σε ορισμένους εντομοπαθογόνους ιούς.

Ετσι, φαίνεται ότι το έντομο είναι ευαίσθητο στον ιό που απομονώθηκε από τον ίδιο το δάκο και που χορηγήθηκε είτε δια της στοματικής οδού είτε με έγχυση στη γενική κοιλότητα του εντόμου. Ο ιός αυτός που ανευρίσκεται σε φυσικούς πληθυσμούς του δάκου, φαίνεται ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις γίνεται παθογόνος, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις επιτρέπει στο έντομο να επιζήσει.

Η μόλυνση δια της στοματικής οδού δείχνει ότι οι ιοί αυτοί εγκαθίστανται στη στομαχική κοιλότητα του εντόμου, τη διαπερνούν και δημιουργούν αλλοιώσεις παρά το γεγονός ότι το πεπτικό σύστημα στα έντομα ενεργεί ως φυσικό εμπόδιο για τις διάφορες μολύνσεις. Η σημασία αυτού του είδους της μόλυνσης είναι μεγάλη, διότι δείχνει ότι οι ιοί μπορούν να εξαπλωθούν με τη διασπορά των αποχωρημάτων του εντόμου στο περιβάλλον και η μόλυνση να γίνει οριζόντια από άτομο σε άτομο και κάθετα από γενεά σε γενεά.

Η μόλυνση με έγχυση επέτρεψε εκτιμηθεί η παθογόνος ικανότητα και ορισμένων άλλων ιών όταν εισέρχονται μέσα στην αιμόλεμφο και η δυνατότητα πολλαπλασιασμού τους στους ιστούς του εντόμου, με την πρόκληση αξιοσημείωτης θνησιμότητας.

Οι ιοί που αποδείχτηκαν παθογόνοι στο δάκο ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες και είναι: Ο ιός που απομονώθηκε από το δάκο, τύπου Reovirus, έχει διάμετρο 60 nm περίπου. Οι ιοί αυτού του τύπου περιέχουν διπλή αλυσίδα RNA, έχουν κυβική συμμετρία και τα βίριον είναι γυμνά. Ο ιός CrPV είναι ένας Picornavirus με απλή αλυσίδα RNA, έχει κυβική συμμετρία και τα βίριον του είναι γυμνά. Ο ιός CIV είναι ένας Iridovirus, με διπλή αλυσίδα DNA, που έχει κυβική συμμετρία και τα βίριον είναι γυμνά. Ο Densovirus της *J. coenia* είναι ένας ιός με απλή αλυσίδα DNA, έχει κυβική συμμετρία και τα βίριον είναι γυμνά. Ο ιός I του *C. capitata* είναι ένας Reovirus συγγενής ως προς τη δομή με τους ιούς του δάκου.

Από τα ανωτέρω φαίνεται ότι ο δάκος μπορεί να μολυνθεί με ιούς DNA και RNA απλής ή διπλής αλυσίδας, και γυμνούς από κάλυμμα. Εν τούτοις αν και το έντομο είναι ευαίσθητο σε ορισμένους ιούς η εκδήλωση επιζωοτιών δεν είναι συχνή γιατί πιθανόν ο βιολογικός κύκλος του δεν προσφέρει ευκαιρίες ισχυρών μολύνσεων.

3.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΩΝ ΙΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΗ Η ΤΕΧΝΗΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ

3.4.1. Εισαγωγή

Τα ειδικά χαρακτηριστικά της ιολογικής παθογένεσης στις ιώσεις του δάκου μελετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η παρατήρηση των υπερλεπτών τομών των διαφόρων ιστών όπου εγκαθίστανται οι ιοί, επέτρεψε τη διερεύνηση της μορφολογίας τους μέσα στους ιστούς, τον εντοπισμό της ιολογικής μορφογένεσης, το είδος των κυττάρων και την θέση μέσα στα κύτταρα που γίνεται η αναπαραγωγή τους και τελικά τη διαφοροποίηση και το χαρακτηρισμό της ασθένειας.

3.4.2. Υλικά και μέθοδοι

Για την εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε φυσικός πληθυσμός του δάκου προέλευσης Καρύστου, που είχε διαπιστωθεί η ύπαρξη ιών τύπου Reovirus καθώς και πληθυσμός προέλευσης Μαραθώνα ο οποίος είχε ελεγχθεί και είχε βρεθεί ότι είναι απαλλαγμένος από ιούς. Στον καθαρό πληθυσμό έγινε μόλυνση με έγχυση με τους ιούς που είχαν παρουσιάσει τη μεγαλύτερη θνησιμότητα. Μετά τη διαδικασία αυτή τα έντομα τοποθετήθηκαν σε κλωβούς και όταν διαπιστωνόταν θνησιμότητα άνω του 50% και η εξέλιξη της ιολογικής μόλυνσης είχε προχωρήσει, γινόταν τεμαχισμός σε αυτά κάτω από το κοινό μικροσκόπιο, προσήλωση και εγκλεισμός των ιστών όπως περιγράφεται στο 2.3.2.2., κοπή τεμαχιδίων ιστών σε υπερμικροτόμο, τοποθέτηση επάνω στα ειδικά εσχαρωτά πλέγματα (grids) και παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

3.4.3. Αποτελέσματα

3.4.3.1. Μελέτη της υπερμικροσκοπικής δομής της παθογένεσης του Reovirus

Η αναζήτηση των ιών στις λεπτές τομές διαφόρων ιστών επέτρεψε τον εντοπισμό της αναπαραγωγής τους στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου. Στα κύτταρα αυτά, μέσα στο κυττόπλασμα, παρατηρούνται αρκετοί σωροί από πυκνό υλικό που εντοπίζονται από τα διερχόμενα ηλεκτρόνια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Οι συσσωρεύσεις αυτές που αντιστοιχούν σε εκείνες των ιοπλασμάτων, έχουν μία κανονική περίμετρο και

παρουσιάζονται παντοτε τελείως οριοθετημένες, (Εικ. 13). Στη δέσμη των διερχομένων ηλεκτρονίων του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου οι περιοχές αυτές φαίνονται τελείως αδιαφανείς σε σχέση με το κυττόπλάσμα που τις περιβάλλει και η δομή τους παρουσιάζεται κοκκιοϊνώδης.

Η ιολογική μορφογένεση πραγματοποιείται στο εσωτερικό ή στην περιφέρεια του ιοπλάσματος, όπου παρατηρούνται διάφορα στάδια ωρίμανσης των σωματιδίων. Το ιοπλασμικό υλικό αντικαθίσταται προοδευτικά, από τα βίριον (τα ώριμα σωματίδια του ιού) που συναθροίζονται συχνά σε παρακρυσταλλικούς σχηματισμούς (Εικ. 14). Μέσα σε αυτούς τους παρακρυστάλλους τα βίριον εμφανίζουν πολύ καθαρά την πολυγωνική τους περίμετρο και η διαμετρός τους είναι περίπου 60 nm (Εικ. 15). Κάθε ένα από αυτά τα σωματίδια παρουσιάζει μία κεντρική μάζα πολύ σκοτεινή στα ηλεκτρόνια ενώ φαίνεται να περιβάλλονται από μία ζώνη πιο φωτεινή. Αυτή είναι και η τυπική δομή του Reovirus.

Τα βίριον μεταναστεύουν μέσα σε ζώνες επιθηλιακών κυτάρων που μπορεί να απέχουν μεταξύ τους, αλλά σε τελικό στάδιο επαναβρίσκονται συγκεντρωμένα και καταλαμβάνουν προεξέχοντα σημεία του εντέρου (Εικ. 16, 17 και 18). Η συσσώρευση τους σε μεγάλο αριθμό προκαλεί υπερτροφική ανάπτυξη των προεξοχών, που αποκόπτονται από τα κύτταρα και απελευθερώνονται (Εικ. 18 και 19) στο εσωτερικό του εντερικού σωλήνα.

Αυτή η πορεία της πτώσης των βίριον μέσα στον εντερικό σωλήνα εξηγεί το φαινόμενο της αποβολής τους και της παρουσίας τους στα αποχωρήματα του εντόμου.

3.4.3.2. Μελέτη της υπερμικροσκοπικής δομής της παθογένεσης του Iridovirus

Η πειραματική μόλυνση των ακμαίων του δάκου με τον ιό CIV δημιουργεί μία έντονη θνησιμότητα και εμφάνιση μίας χαρακτηριστικής κυανής ιριδόχρωσης στα έντομα, που οδήγησε στην έρευνα των σημείων αναπαραγωγής του ιού στις υπερλεπτές τομές που παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Η μόλυνση παρουσιάζεται διάχυτη σε πολλούς ιστούς και εντοπίζεται κυρίως στα επιδερμικά και περιτραχειακά κύτταρα (Εικ. 20 και 21).

Παρατηρήθηκαν επίσης τα διάφορα στάδια της ιολογικής μορφογένεσης. Τα σωματίδια που εμφανίζονται μέσα στο κυττόπλάσμα σε σχήμα πολυγωνικής δομής είναι στην αρχή με ατελή μορφή και κατόπιν παρουσιάζουν τυπική εξαγωνική περίμετρο (Εικ. 20, 21 και 22). Το περιεχόμενο τους σκουραίνει προοδευτικά για

να σχηματιστεί μία κεντρική ζώνη πολύ πυκνή στα διερχόμενα ηλεκτρόνια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Εικ. 22). Το μέγεθος τους είναι περίπου 130nm.

Μέσα στα κύτταρα που η μόλυνση είναι εντονότερη εμφανίζεται ένας μεγάλος αριθμός σωματιδίων που σχηματίζουν σωρούς διαστάσεων πολλών "microns". Αυτοί οι σωροί που σχηματίζουν παρακρυσταλλικές διατάξεις είναι υπεύθυνοι για το φαινόμενο της κυανής ιριδόχρωσης των μολυνθέντων εντόμων.

3.4.3.3. Μελέτη της υπερμικροσκοπικής δομής της παθογένεσης του ιού CrPV

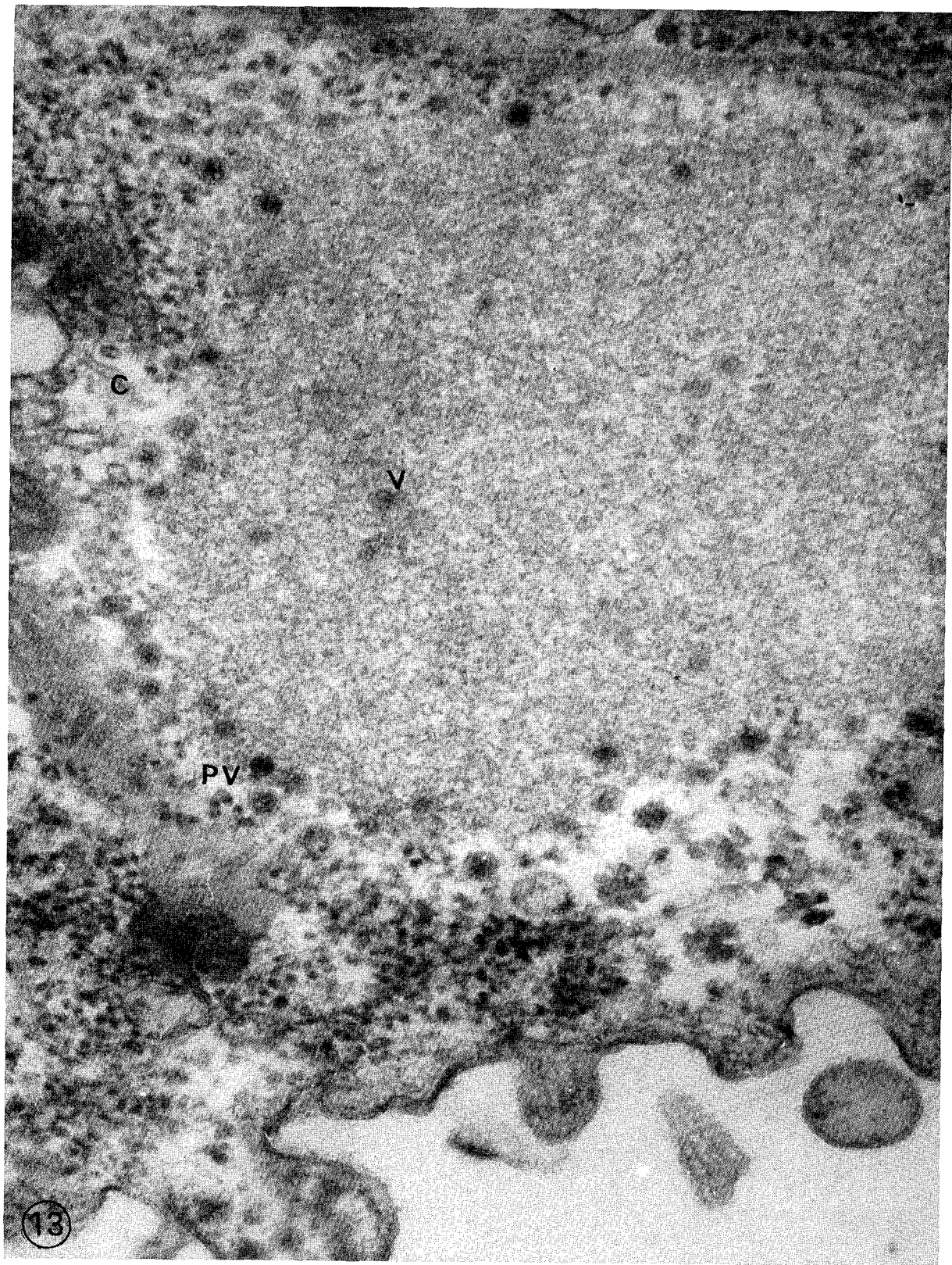
Η εξέταση των υπερλεπτών τομών στους ιστούς των μολυνθέντων με CrPV εντόμων έδειξε ότι η αναπαραγωγή αυτού του ιού γίνεται μέσα σε πολλούς τύπους κυτάρων, κυρίως στα λιπώδη, περιτραχειακά και επιδερμικά κύτταρα των αντιστοιχών ιστών (Εικ. 23,24,25).

Τα ιολογικά σωματίδια γενικά εμφανίζονται στο εσωτερικό των κυτταρικών κενοτοπίων, τα οποία ορίζονται από μία μεμβράνη τριών στρώσεων, τύπου πυκνού ενδοπλασμικού πλέγματος. Η αδυναμία διάκρισης του πραγματικού ιοπλάσματος και το μικρό μέγεθος των σωματιδίων δεν επέτρεψε την καθαρή οπτική εικόνα της μορφογένεσής τους. Μέσα σε αυτές τις κύστες τα βίριον συναθροίζονται σχηματίζοντας μάζες πολύ ισχυρής αδιαφάνειας στα ηλεκτρόνια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Εικ. 26). Η συγκέντρωση ιών με εξαγωνική περίμετρο οδηγεί στο σχηματισμό παρακρυσταλλικών διατάξεων (Εικ. 261).

Η μόλυνση από τον ιό συνοδεύεται από βαθύτερες μεταβολές των κυτάρων. Εμφανίζεται μία διαύγεια του κυττοπλάσματος μέσα στο οποίο τα πολυάριθμα κενοτόπια μοιάζουν με γραμμές εκφυλισμένου μυελού. Τα μιτοχόνδρια υφίστανται χαρακτηριστικές αλλοιώσεις όπως διόγκωση και διαύγηση του υλικού τους (Εικ. 26).

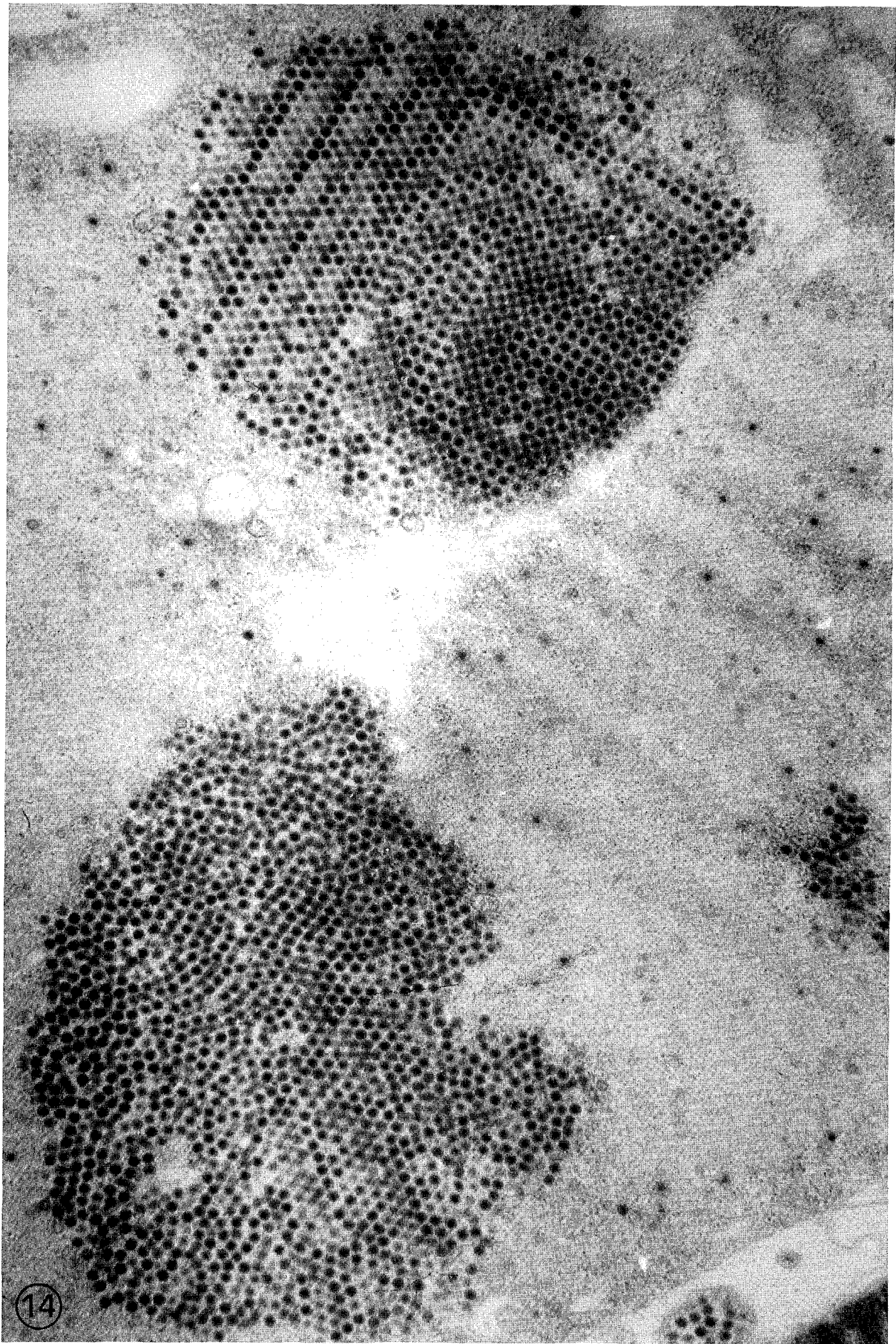
EIKONA 13

Εικ. 13. Υπερμικροσκοπική δομή επιθηλιακού κυττάρου του μεσεντέρου δάκου που έχει μολυνθεί από Reovirus. Παρατηρείται μέσα το κυττόπλασμα (C), το ιόπλασμα (CV), με δομή κοκκιοϊνώδη, από όπου ξεκινά η συγκέντρωση των ιολογικών σωματιδίων (PV).
x 83.500



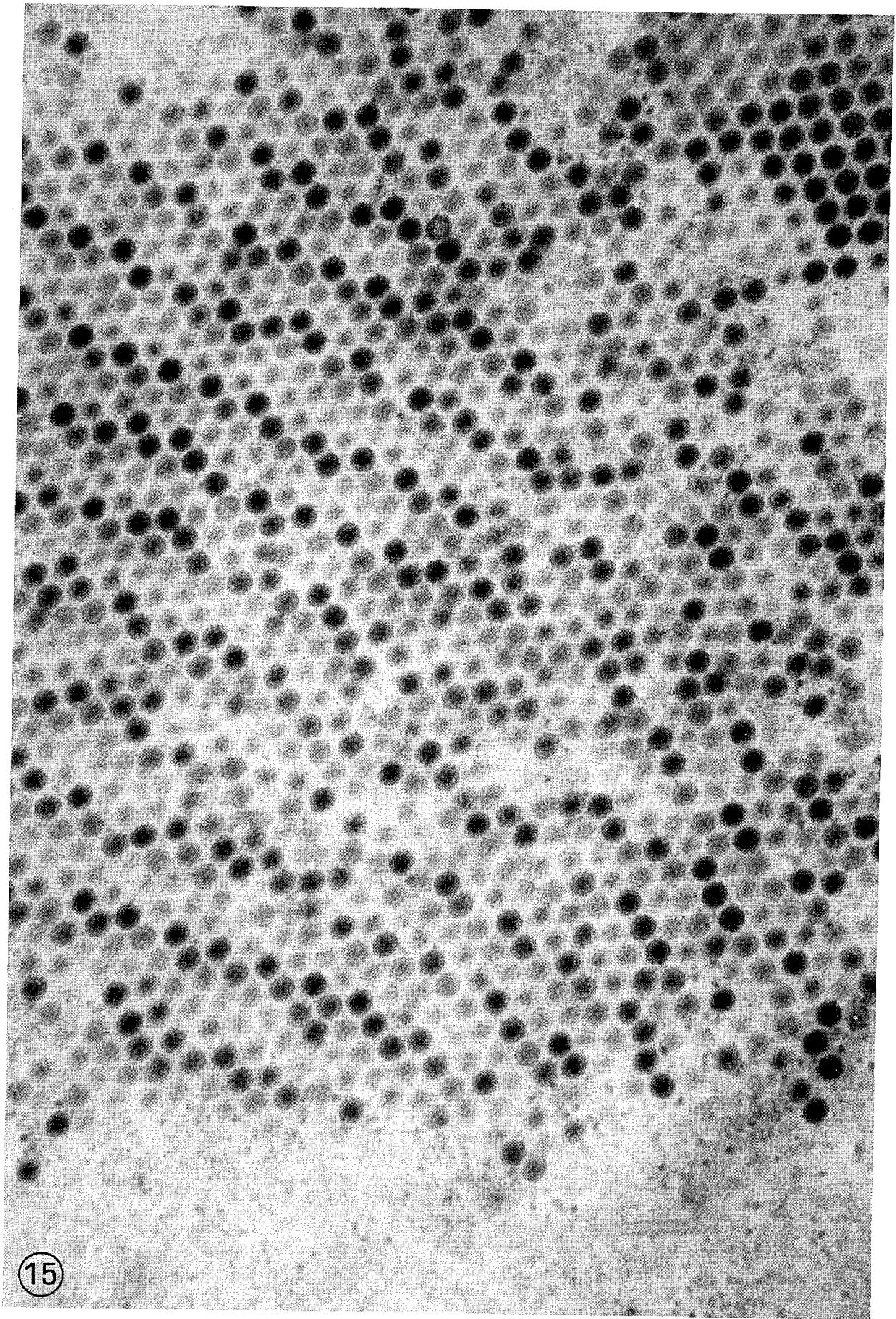
EIKONA 14

Εικ. 14. Υπερμικροσκοπική τομή, όπου διακρίνονται κυττοπλασμική σωροί από βίριον του Reovirus που έχουν παρακρυσταλλική διάταξη στην περιφέρεια των εντερικών κυττάρων που αντιστοιχούν σε λογενείς περιοχές.
x 40.000



EIKONA 15

Εικ. 15. Λεπτομέρεια παρακρυσταλλικής διάταξης των βίριον του Reovirus σε ένα στάδιο προχωρημένης μόλυνσης στο δάκο.
x 83.500



15

EIKONA 16

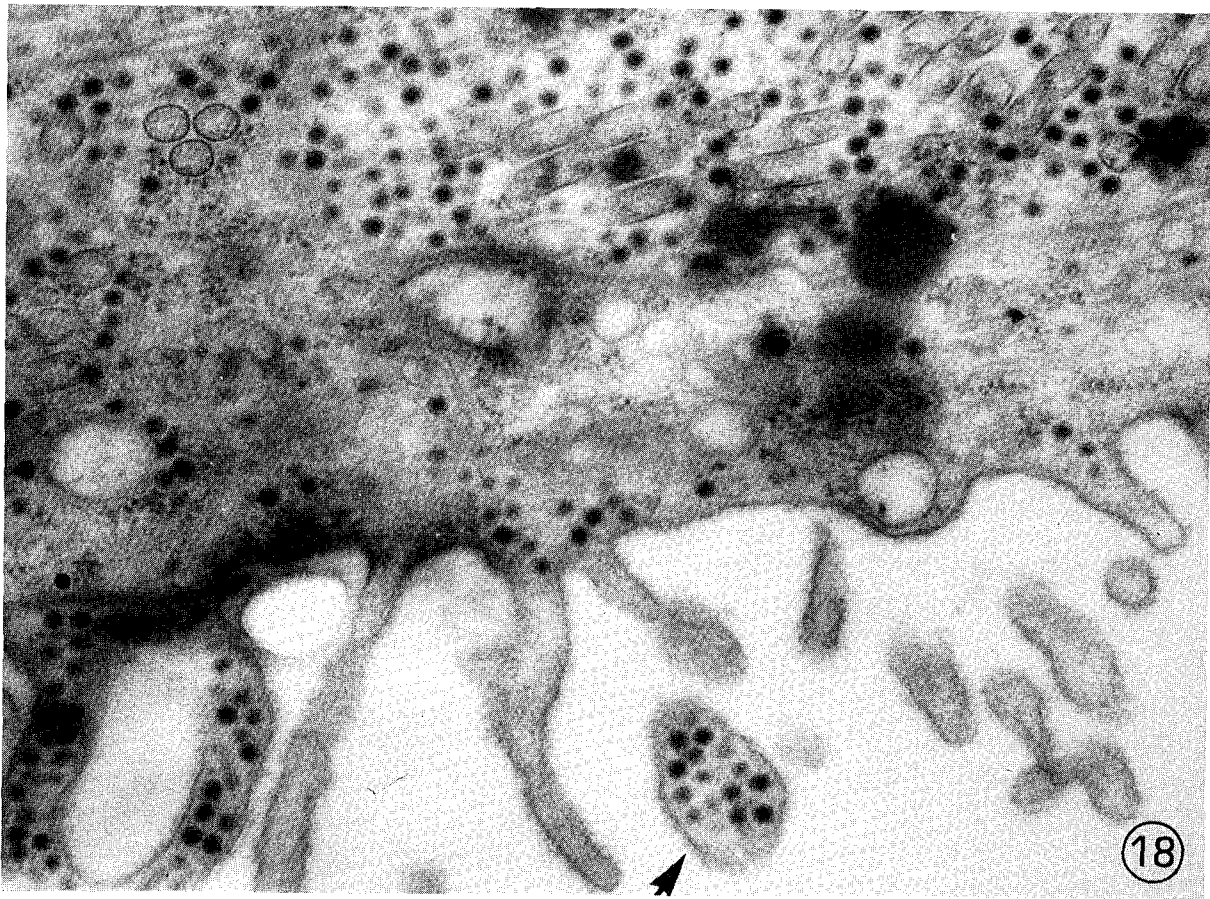
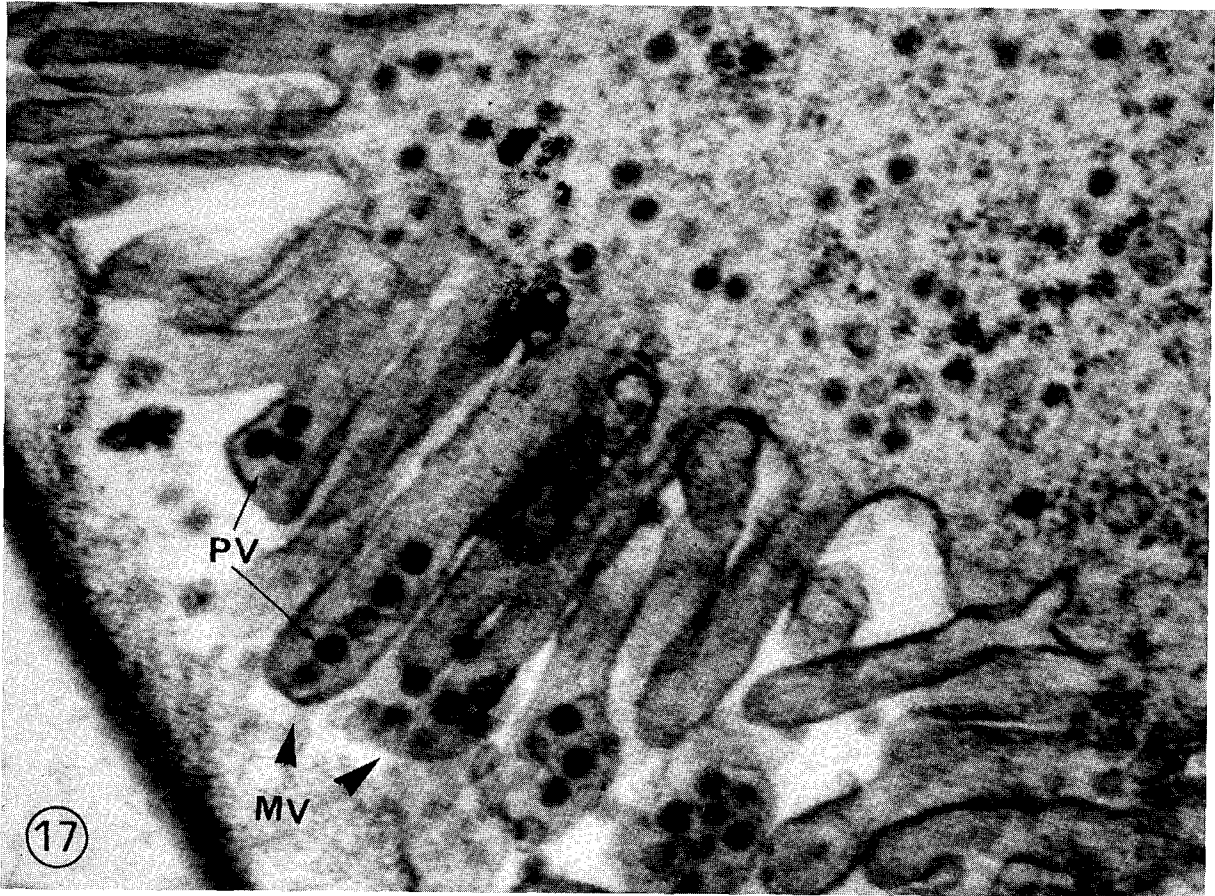
Εικ. 16. Υπερμικροσκοπική δομή των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντέρου του δάκου όπου παρατηρούνται στην περιφέρεια ιοπλάσματα και συνάθροιση ιολογικών σωματιδίων του Reovirus τα οποία διαπερνούν τις τριχοειδείς απολήξεις.
V: Ελεύθερος ιός στο φωτεινό τμήμα του εντέρου.
x 83.500



EIKONA 17

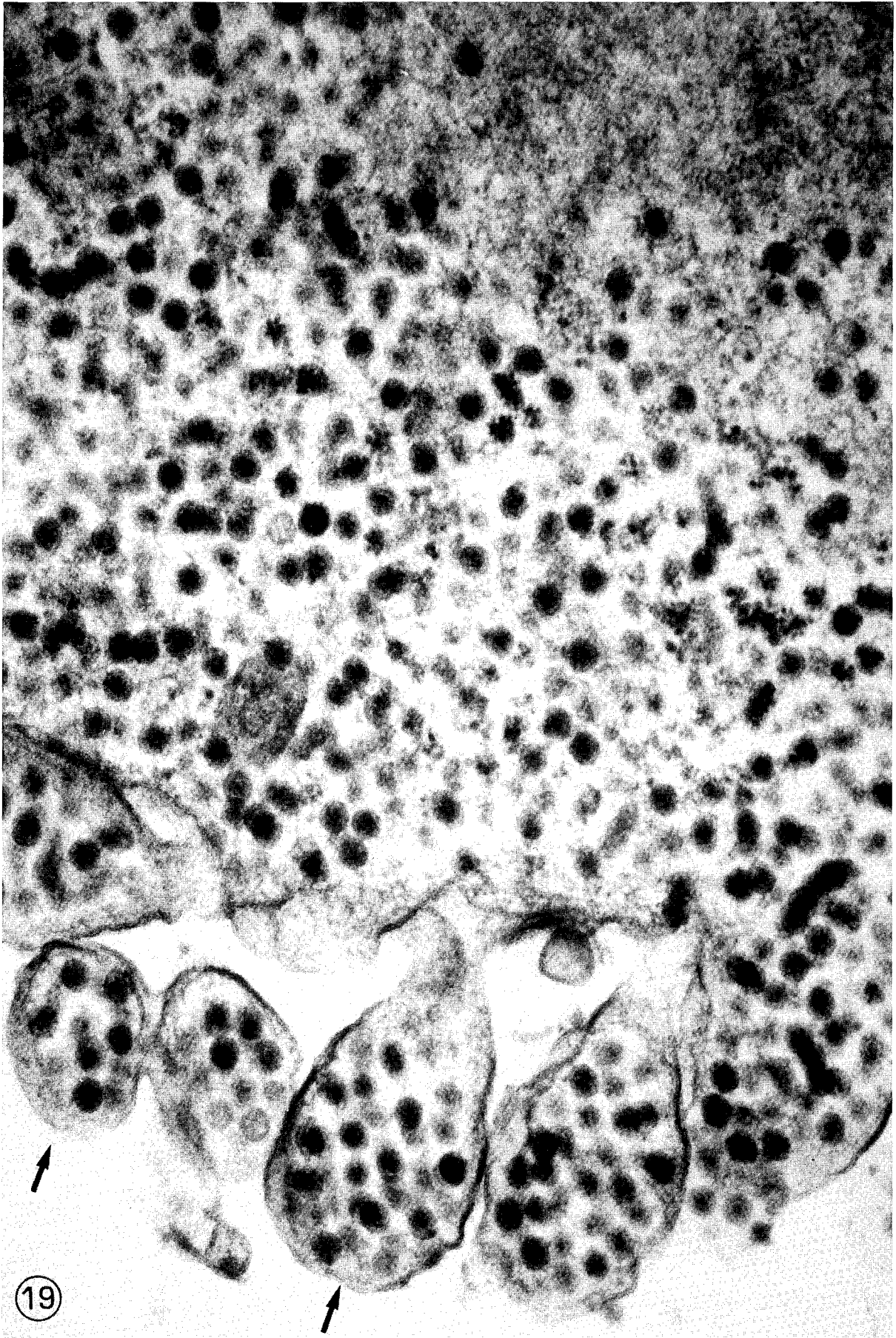
Εικ. 17. Ιολογικά σωμάτια (PV) του Reovirus που παρατηρούνται στα εντερικά μικροτριχίδια (M.V.) του δάκου.
x 83.500

Εικ. 18. Σωμάτια του Reovirus που διαπερνούν εντερικές προεξοχές του δάκου.
Αυτή η παρατήρηση, είναι όμοια με εκείνης των ελευθέρων ιών μέσα στον εντερικό σωλήνα ή των ιών που περιβάλλονται πολλοί μαζί με μία μεμβράνη πλασμικού τύπου και δημιουργούν μία απόρριψη των σωματιδίων προοδευτικά. Το φαινόμενο ονομάζεται exocytosis (το άδειασμα του περιεχομένου ενός κυττάρου).
x 55.000



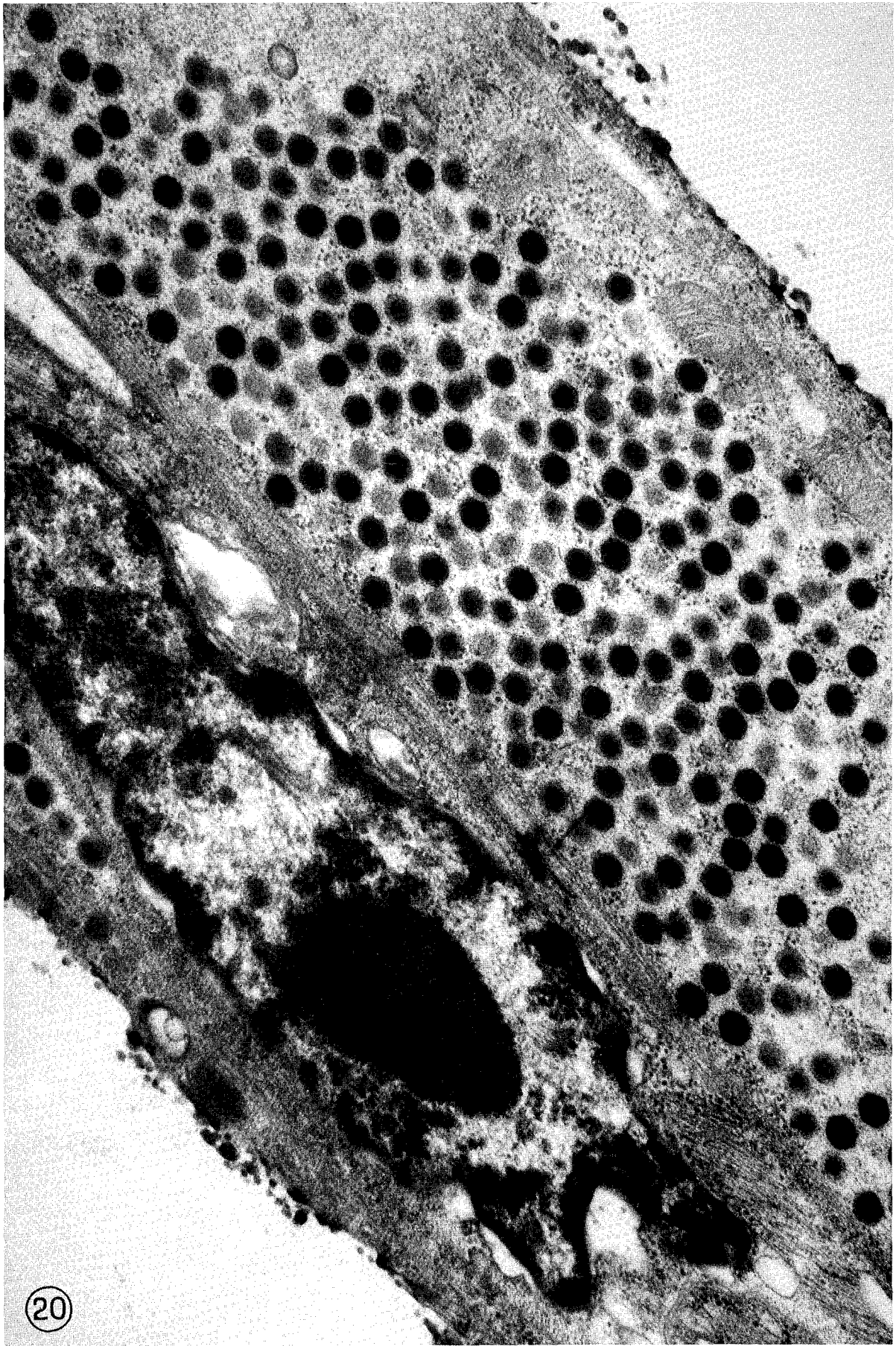
EIKONA 19

Εικ. 19. Υπερτροφικά μικροτριχίδια του μεσεντέρου του δάκου, που περιέχουν πολυάριθμους ιούς τύπου Reovirus. Μερικά μοιάζουν να αποκολλώνται και να επιπλέουν μέσα στο εσωτερικό του εντερικού σωλήνα.
x 100.000



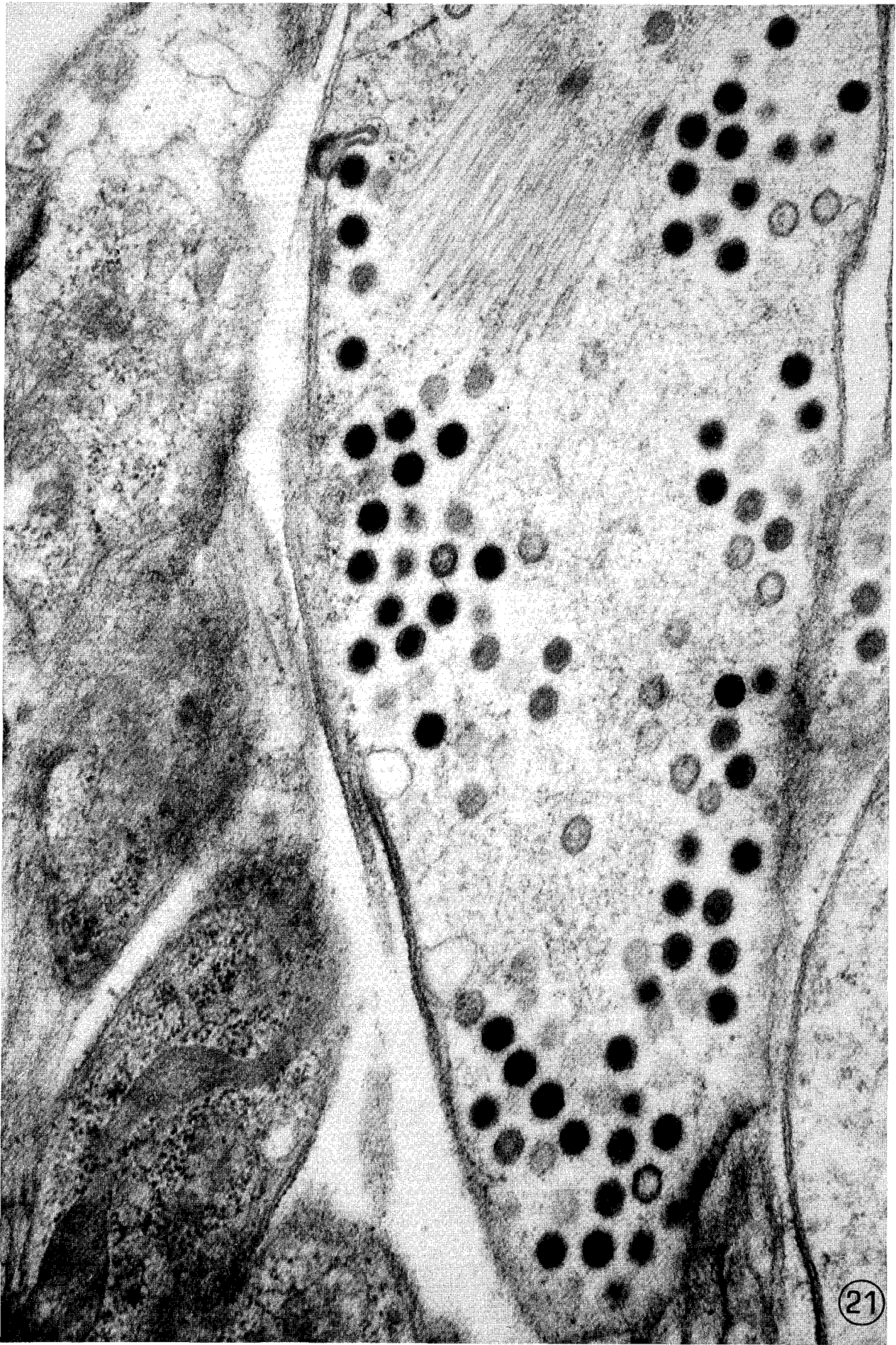
EIKONA 20

Εικ. 20. Υπερμικροσκοπική τομή επιδερμικού κυττάρου του δάκου που είχε μολυνθεί πειραματικά με τον ιό CIV. (Iridovirus του *Chilo suppressalis*)
x 41.500



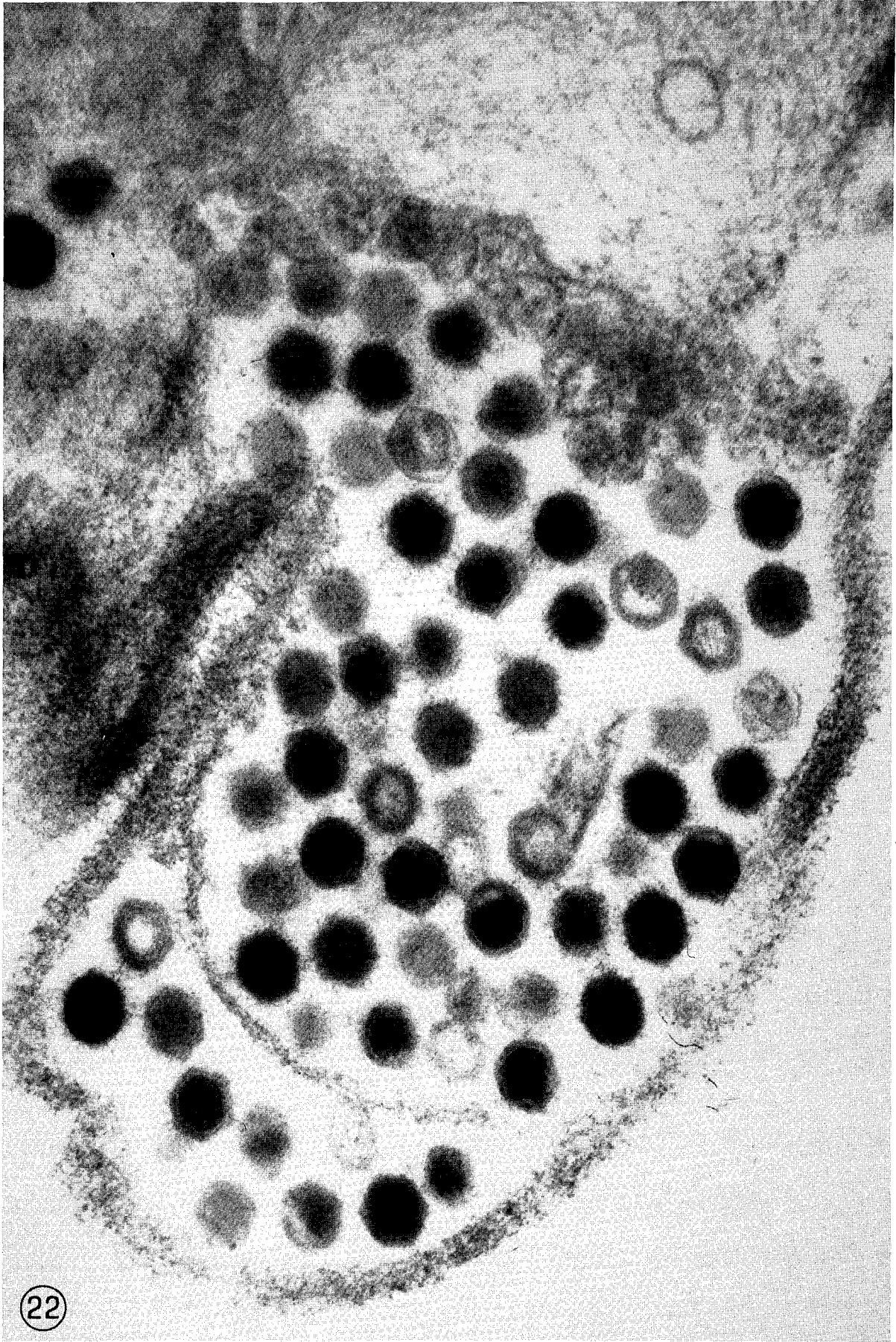
EIKONA 21

Εικ. 21. Μορφογένεση του ιού CIV (Iridovirus του *C. suppressalis*) σε ένα περιτραχειακό κύτταρο του δάκου μετά από πειραματική μόλυνση.
x 41.000



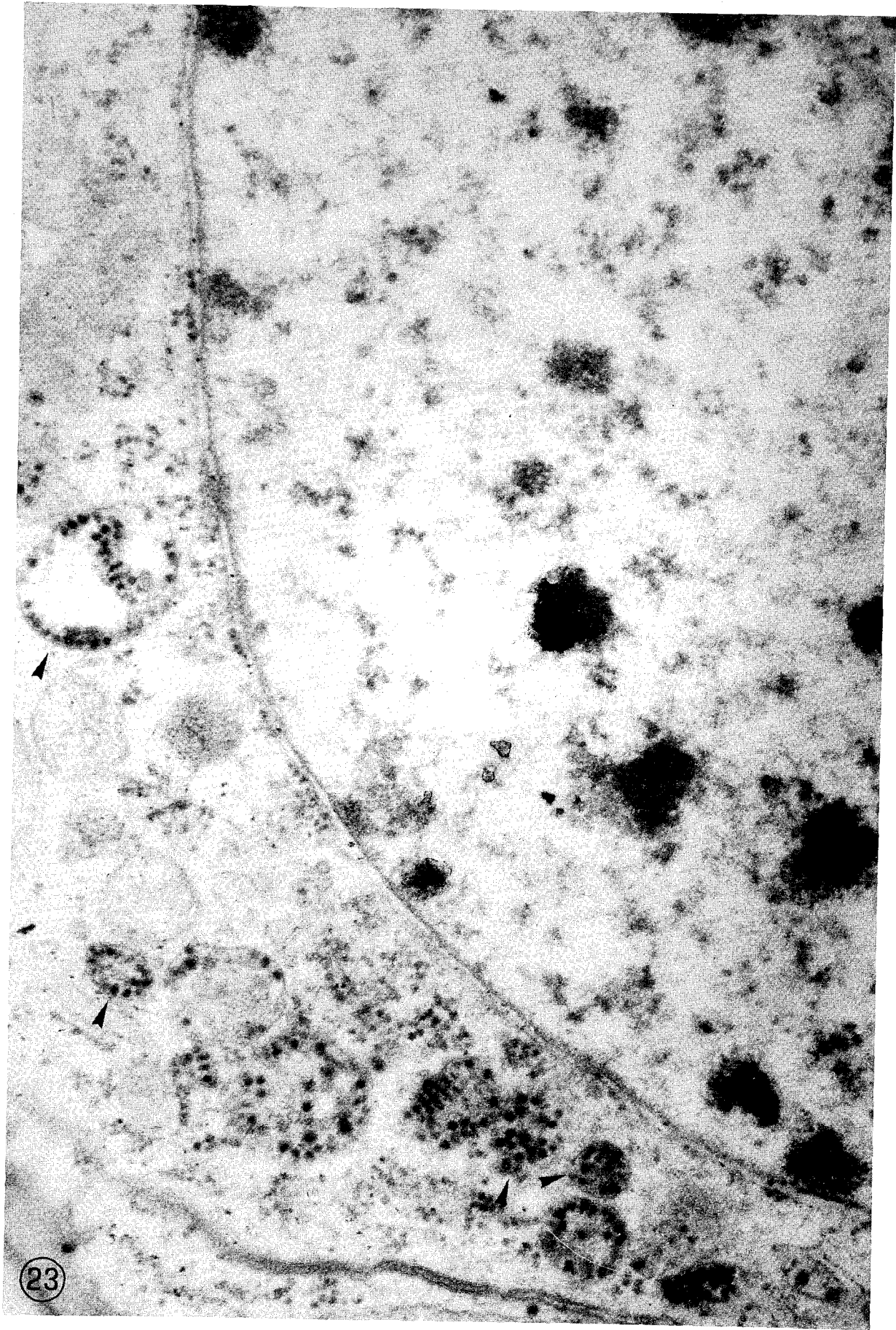
EIKONA 22

Εικ. 22. Υπερμικροσκοπική τομή στο κυττόπλασμα του λιπώδους ιστού του δάκου μετά από μόλυνση του ιού CIV (Iridovirus του *C. suppressalis*). Τα ιολογικά σωματίδια με εξαγωνική περίμετρο αποτελούνται από μία κεντρική μάζα πυκνή στα ηλεκτρόνια που αντιστοιχούν με το DNA και περιβάλλονται από ένα καψίδιο που σχηματίζεται από 2 μεμβράνες ενωτικού τύπου
x 72.000



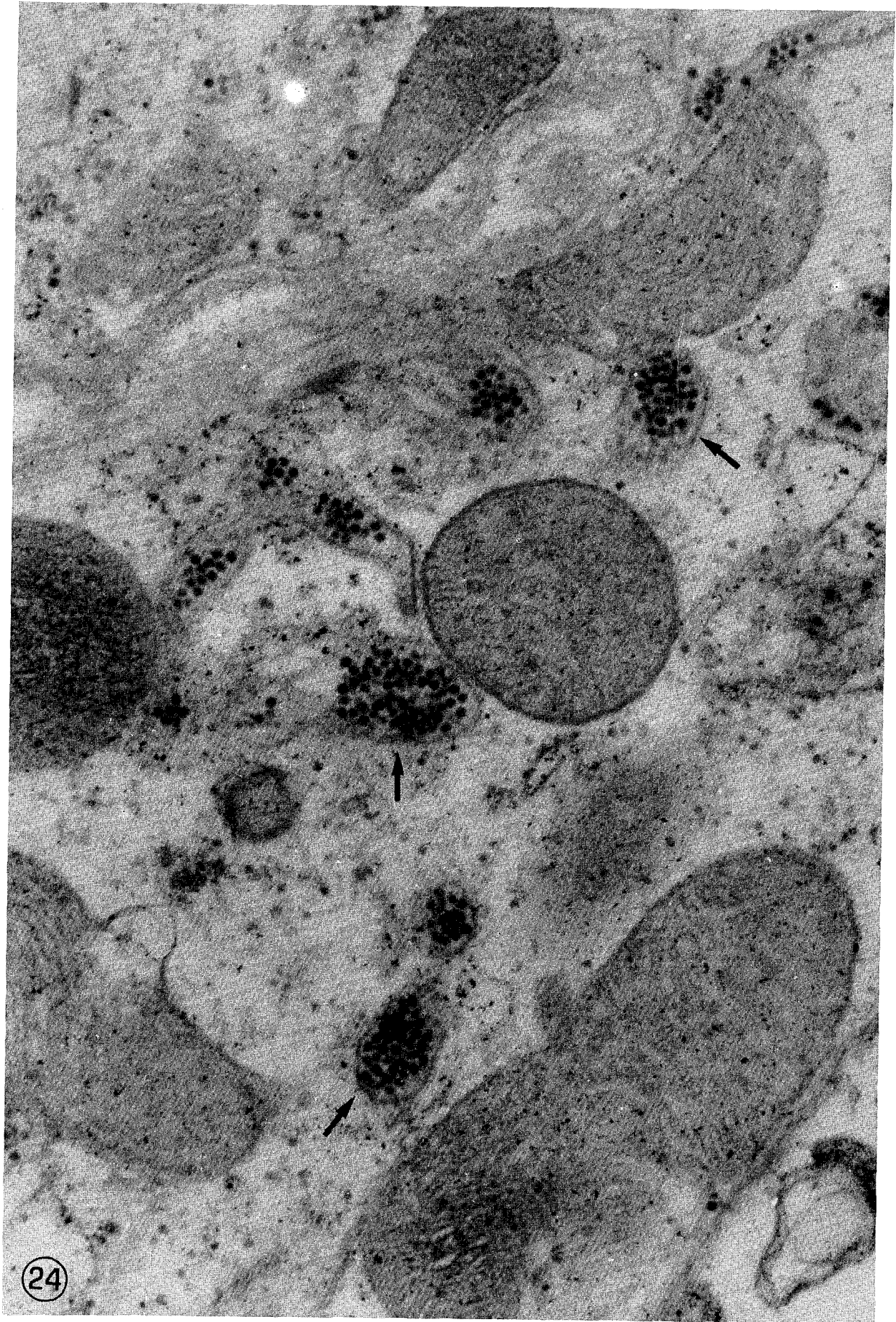
EIKONA 23

Εικ. 23. Υπερμικροσκοπική τομή λιπωδών κυττάρων του δάκου μολυνθέντων με ιούς CrPV (Picornavirus της παράλυσης των γρύλλων)
Δεν διακρίνεται το πραγματικό ιόπλασμα και το μικρό μέγεθος των σωματιδίων δεν επιτρέπει την καθαρή οπτική εικόνα της μορφογένεσής τους.
x 66.500



EIKONA 24

Εικ. 24. Υπερμικροσκοπική τομή ενός περιτραχειακού κυττάρου του δάκου μετά από μόλυνση με CrPV (Picornavirus της παράλυσης των γρύλλων). Τα βίριον (V) συγκεντρώνονται σχηματίζοντας μάζες πολύ αδιαφανείς στα διερχόμενα ηλεκτρόνια.
x 66.500



EIKONA 25

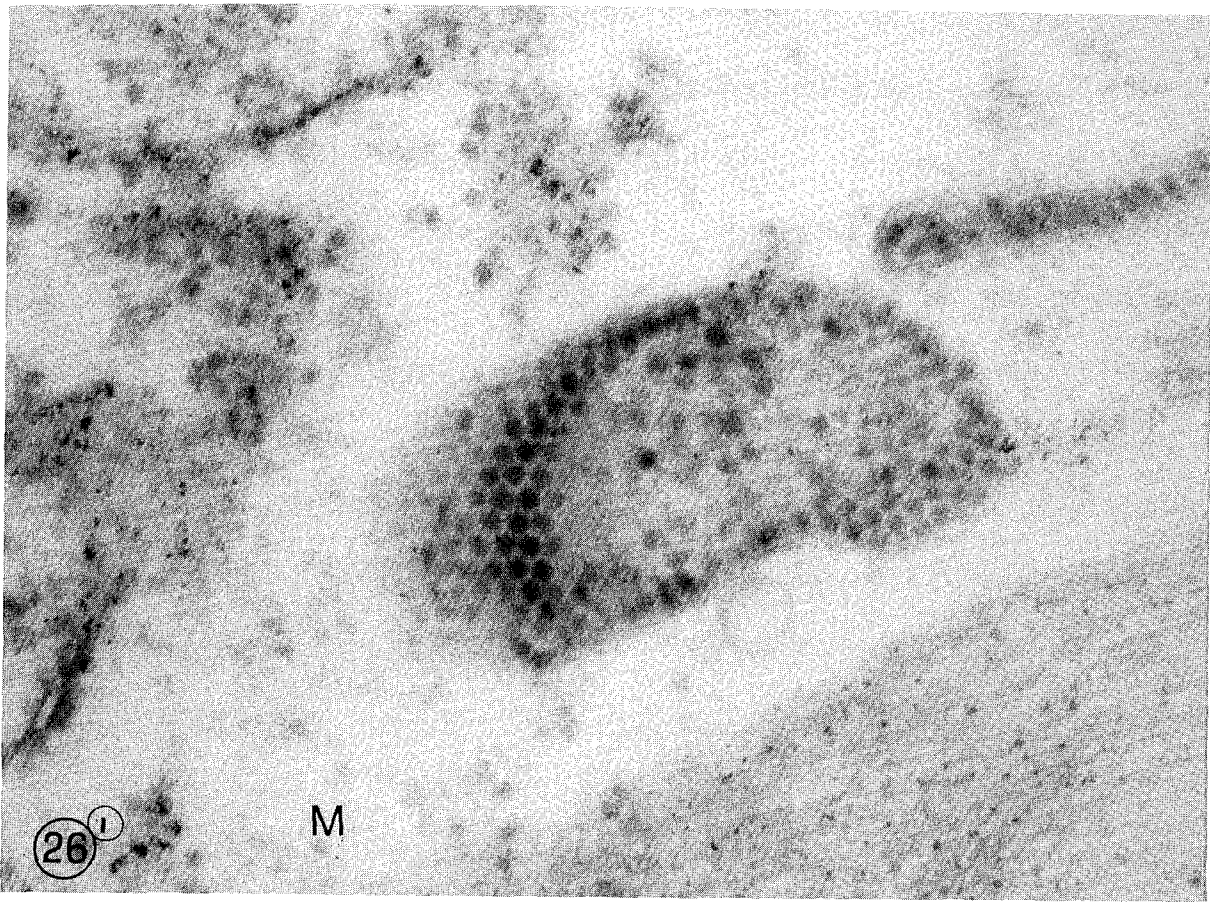
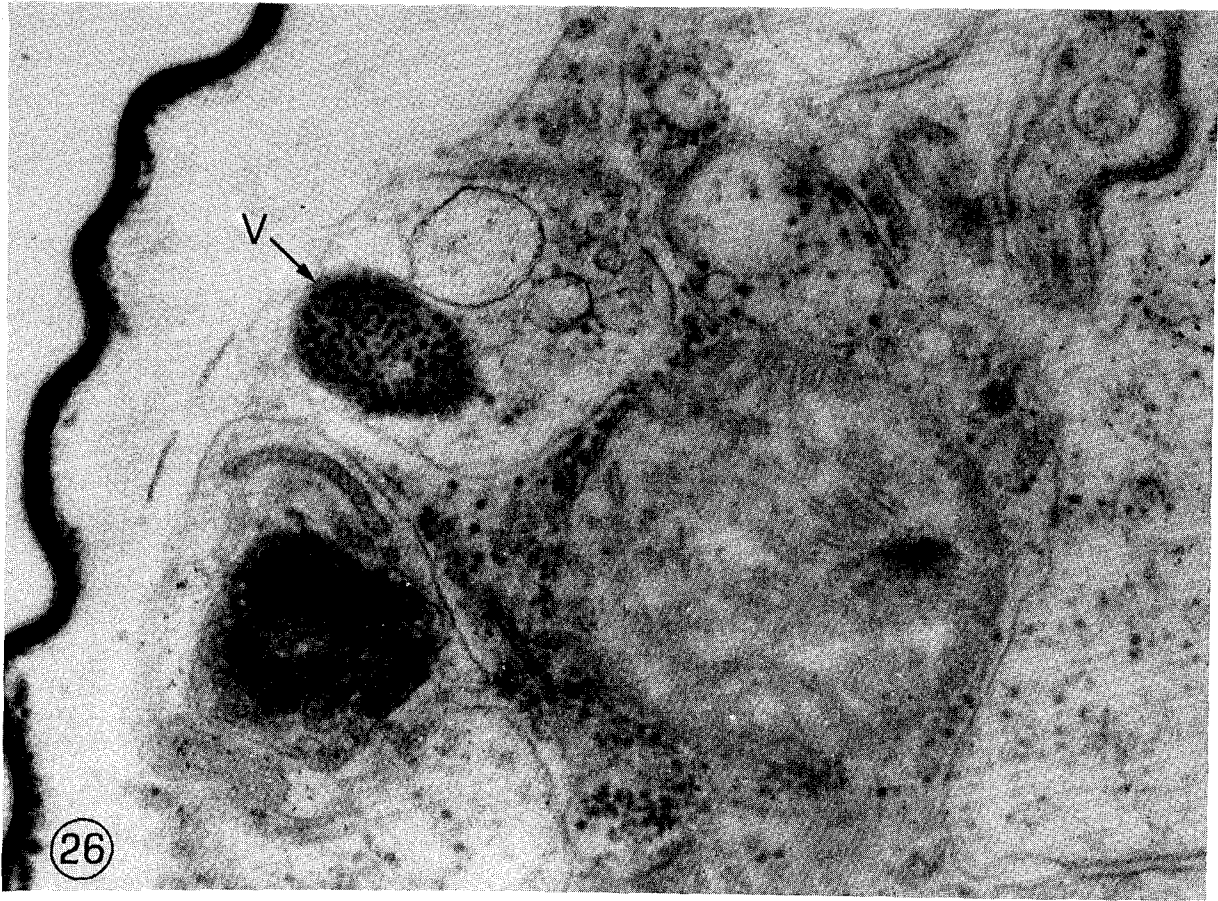
Εικ. 25. Λεπτομέρεια επιδερμικού κυττάρου του δάκου μετά από μόλυνση με CrPV (Picornavirus της παράλυσης των γρύλλων). Τα ιολογικά σωματίδια εμφανίζονται γενικώς στο εσωτερικό των κυττοπλασμικών κενοδοπίων οριζόμενα από μία μεμβράνη.
x 66.500



EIKONA 26

Εικ. 26. Υπερμικροσκοπική τομή περιτραχειακού κυττάρου του δάκου μολυνθέντος από ιούς CrPV (Picornavirus της παράλυσης των γρύλλων).
V: κύστη οριζόμενη από μεμβράνη που περικλείει συσσωρευμένους ιούς. Χαρακτηριστικά εμφανίζεται η υπερτροφία του μιτοχονδρίου και η διαύγαση του υλικού του.
x 66.500

Εικ. 261. Παρακρυσταλλική διάταξη των ιολογικών τεμαχιδίων CrPV (Picornavirus της παράλυσης των γρύλλων), μέσα σε μία κυττοπλασμική κύστη των λιπωδών κυττάρων του δάκου.
M: Υπερτροφικό μιτοχόνδριο.
x 100.000



3.5. ΔΟΜΗ, ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ REOVIRUS

3.5.1. Εισαγωγή

Μια ακριβής γνώση του ιού τύπου Reovirus, που ανευρέθηκε στους φυσικούς πληθυσμούς του δάκου θεωρήθηκε απαραίτητη, αφ' ενός για να επιχειρηθεί η συστηματική του κατάταξη και αφ' ετέρου να εξακριβωθούν τα ιδιαίτερα βιοχημικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν στους ιούς διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες. Έτσι παρακάτω περιγράφεται η διαδικασία του καθαρισμού του ιού και παρατίθεται πρωτόκολλο για τη διαδικασία της εργασίας αυτής, μελετάται η δομή του βίριον στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, γίνεται η φασματομετρική ανάλυση και η μέτρηση της πυκνότητας ισορροπίας και τέλος επιχειρείται η βιοχημική ανάλυση που περιλαμβάνει τη διερεύνηση της φύσης του νουκλεϊνικού του οξέος και την ηλεκτροφορητική ανάλυση του γονιδιώματός του.

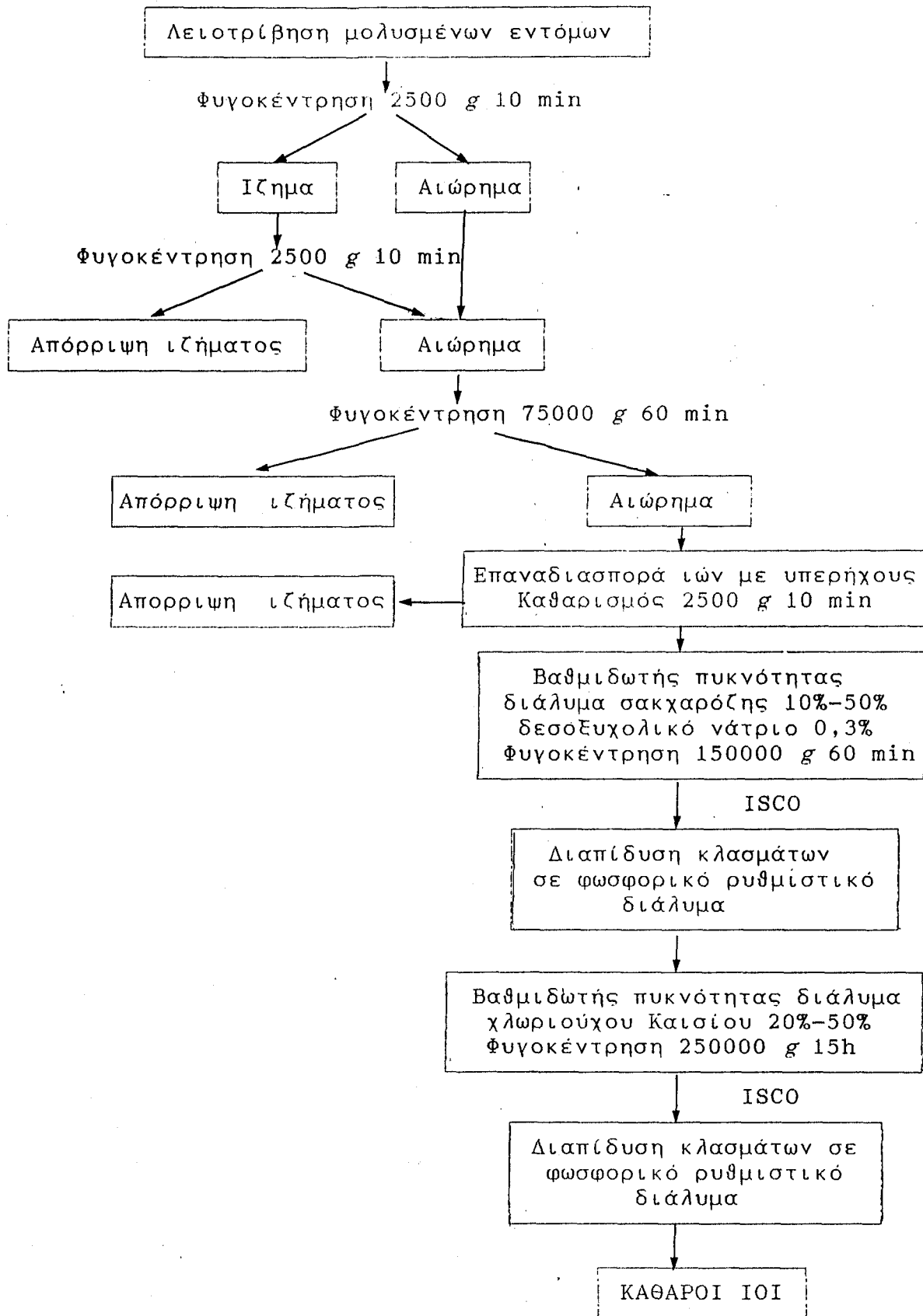
3.5.2. Καθαρισμός του ιού

Ο πολλαπλασιασμός των ιών τύπου Reovirus, για τις ανάγκες της μελέτης, πραγματοποιήθηκε σε έντομα τεχνητής εκτροφής προέλευσης "Δημοκρίτου" που μολύνονταν "per os" κατά εκατοντάδες. Τα έντομα παρέμεναν 10 ημέρες περίπου στον κλωβό και κατόπιν συγκεντρώνονταν νεκρά και ζωντανά και κατά ποσότητες εναποθηκεύονταν στους -20°C . Λειτουργούνταν με τη βοήθεια ενός μηχανικού λειοτριβητή (μάρκας "POTTER") προσθέτοντας φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,05M με pH 7,4 σε αναλογία όπως περιγράφεται στο 2.2.1.1., αφού βυθιζόταν το όλο σύστημα σε τριμμένο πάγο για την αποφυγή καταστροφής των ιών λόγω αναπτυσσομένων υψηλών θερμοκρασιών.

Για να επιτευχθεί η εξαγωγή, ο καθαρισμός των ιών και η συγκέντρωση αρκετής ποσότητας ιολογικού διαλύματος για τις μελέτες και τα πειράματα, η διαδικασία επαναλήφθηκε πολλές φορές. Έτσι καθιερώθηκε μία τεχνική για την εξαγωγή και τον καθαρισμό του ιού του δάκου της ελιάς που αναφέρεται στο κεφάλαιο 2.4. Συνοπτικό πρωτόκολλο της διαδικασίας αυτής παρατίθεται στον Πίνακα III.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής, μετά την τοποθέτηση του αιωρήματος στην κορυφή του βαθμιδωτού γραμμικού διαλύματος σακχαρόζης και της φυγοκέντρωσης σε 150.000g για 1ώρα, παρατηρώντας με γυμνό οφθαλμό τα βαθμιδωτά διαλύματα παρουσιάζουν μία ζώνη ελαφρώς κυανίζουσα ευρισκόμενη κυρίως στο κέντρο του ύψους του σωλήνα φυγοκέντρωσης. Τα

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ
ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΙΩΝ



διαβαθμισμένα σακχαρικά διαλύματα αναλύονται με τη βοήθεια συσκευής διαχωρισμού κλασμάτων ISCO. Σε φάσμα απορρόφησης 256nm (Εικ. 27) φανερώνεται στο αυτογραφικό χαρτί μία ανύψωση της καμπύλης, που την ακολουθεί μία κυρία κορυφή της καμπύλης.

Από τα κλάσματα αυτά που χωρίζονται από τη συσκευή ISCO σε σωληνίσκους, ελήφθησαν εκείνα που αντιστοιχούσαν στις δύο ανυψώσεις της καμπύλης. Τοποθετήθηκαν σε ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης, που κλείστηκαν και βυθίστηκαν σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (3 με 4 υδατόλουτρα για 48 ώρες) προς διαπίδυση, ώστε να απομακρυνθεί η σακχαρόζη και το δεσοξυχολικό νάτριο.

Οι παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι στη μικρή ανύψωση της καμπύλης περιέχονται κατά το μεγαλύτερό τους μέρος κενά σωματίδια, που έχουν διαβρωθεί από το φωσφοροβολφραμικό οξύ (phosphotungstique acid), ενώ στην κύρια κορυφή της καμπύλης περιέχονται σε πολύ υψηλό ποσοστό πλήρη σωματίδια.

Το διάλυμα βαθμιδωτής πυκνότητας σακχαρόζης δεν επιτρέπει την απομάκρυνση όλων συνολικά των μολυσμάτων και κυρίως τον τέλειο χωρισμό των κενών από τα πλήρη σωματίδια. Έτσι, τα δύο κλάσματα που λαμβάνονται μετά από τη διαπίδυση τοποθετούνταν στην άνω επιφάνεια δύο σωλήνων φυγοκεντρήσεως που περιείχαν ένα διαβαθμισμένης γραμμικής πυκνότητας διάλυμα χλωριούχου Καισίου 20%-50%. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνταν για 15 ώρες στα 250.000g ώστε να επιτραπεί στα ιολογικά σωματίδια να λάβουν την ισορροπία τους θέση μέσα στην ισοπυκνική τους ζώνη. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αναγνωρίζονται πολύ καθαρά δύο ζώνες. Η καταγραφή της κατανομής της καμπύλης του διαβαθμισμένου διαλύματος που αναλύεται στον κλασματοποιητή ISCO, δείχνει την ύπαρξη δύο κορυφών τελείως χωρισμένων (Εικ. 271). Τα κλάσματα που αντιστοιχούν στις καμπύλες παραλαμβάνονται και τοποθετούνται σε μεμβράνες προς διαπίδυση κατά τον ίδιο τρόπο όπως στο βαθμιδωτό διάλυμα σακχαρόζης. Τα παραλαμβανόμενα διαλύματα είναι έτοιμα για να χρησιμοποιηθούν ή να μελετηθούν.

3.5.3 Δομή του βίριον

Η παρατήρηση των αιωρημάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με αρνητική χρώση από φωσφοροβολφραμικό οξύ (PTA) δείχνει ότι η ζώνη που βρίσκεται πιο ψηλά στο βαθμιδωτό διάλυμα πρικλείει γενικά σωματίδια κενά, ενώ η ζώνη που βρίσκεται προς τη βάση περιέχει πλήρη ιολογικά σωματίδια μεγάλης καθαρότητας (Εικ. 28, 281).

Τα σωματίδια που δεν έχουν διαβρωθεί από το PTA έχουν σχήμα

παρασφαιρικό και διάμετρο περίπου 60nm. Αποτελούνται από ένα κεντρικό τμήμα που σχηματίζει ένα πυρήνα ή καρδιά ("core" όπως διεθνώς ονομάζεται) και περιβάλλεται από μία εξωτερική στρώση που αποτελείται από υποενότητες, πάχους 10nm περίπου και είναι διατεταγμένες ως φωτοστέφανο. (Εικ. 29,33).

Το κεντρικό τμήμα του ιού (core) διαθέτει ένα είδος σωληνοειδών αποφύσεων, διατεταγμένων έτσι, ώστε να μοιάζουν ότι καταλαμβάνουν τις κορυφές εικοσαέδρου και οι οποίες είναι τελείως ορατές στα αποδομημένα σωματίδια που έχουν χάσει την εξωτερική τους στοιβάδα (Εικ. 30,32,321).

3.5.4. Φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες φως

Το φάσμα απορρόφησης αιωρήματος ιών που έχουν υποστεί καθαρισμό, είναι το τυπικό φάσμα μίας νουκλεοπρωτεΐνης. Παρουσιάζει ένα μέγιστο απορρόφησης στα 260nm και ένα ελάχιστο στα 248nm (Εικ. 34).

Εκτός από τον έλεγχο της καθαρότητας των παρασκευασμάτων, η φασματομετρική ανάλυση επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ιών στα αιωρήματα. Είναι γνωστό ότι μία μονάδα οπτικής πυκνότητας στα 260nm (1 UDO 260) αιωρήματος ιών του ιδίου τύπου, από άλλες μετρήσεις που έχουν γίνει περιέχει 200 μg βίριον ανα ml. (HULL, 1985)

3.5.5. Πυκνότητα ισορροπίας

Κατά τη διάρκεια της κλασματοποίησης των βαθμιδωτών διαλυμάτων λήφθηκε μία σταγόνα από τα κλάσματα που αντιστοιχούν ακριβώς στη κορυφή κάθε προεξοχής (peak), ώστε να προσδιοριστεί το σημείο διάθλασης του διαλύματος του χλωριούχου Καισίου (SZYBALSKI, 1968). Το σημείο αυτό μετρούμενο με ένα διαθλασίμετρο ABBE που είναι ρυθμισμένο με θερμοστάτη στους 25°C, προσδιορίζει την πυκνότητα του διαλύματος του χλωριούχου Καισίου με αναφορά σε πίνακες αντιστοιχίας και άρα την φαινομενική πυκνότητα των σωματιδίων σε κάθε κλάσμα. Έτσι:

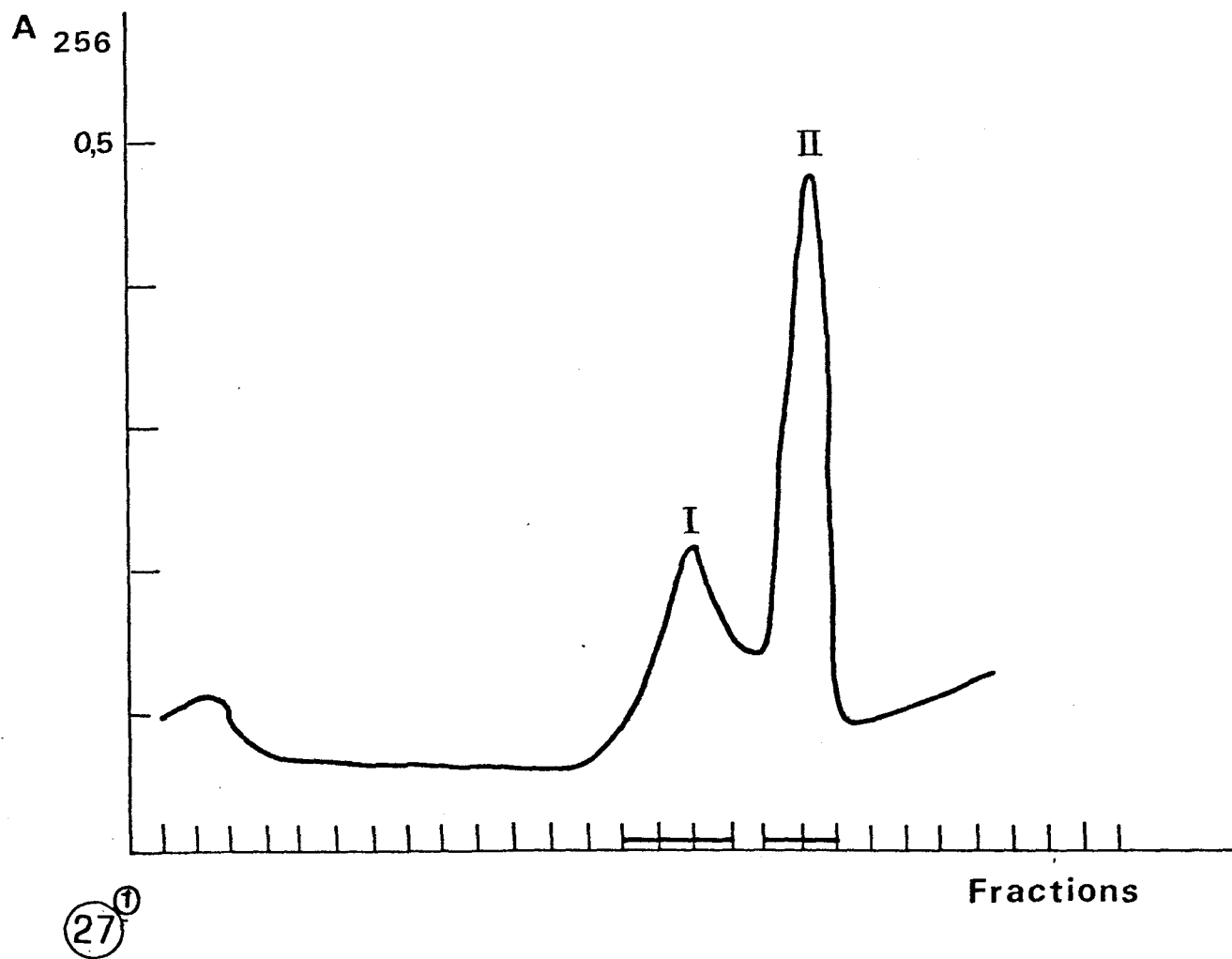
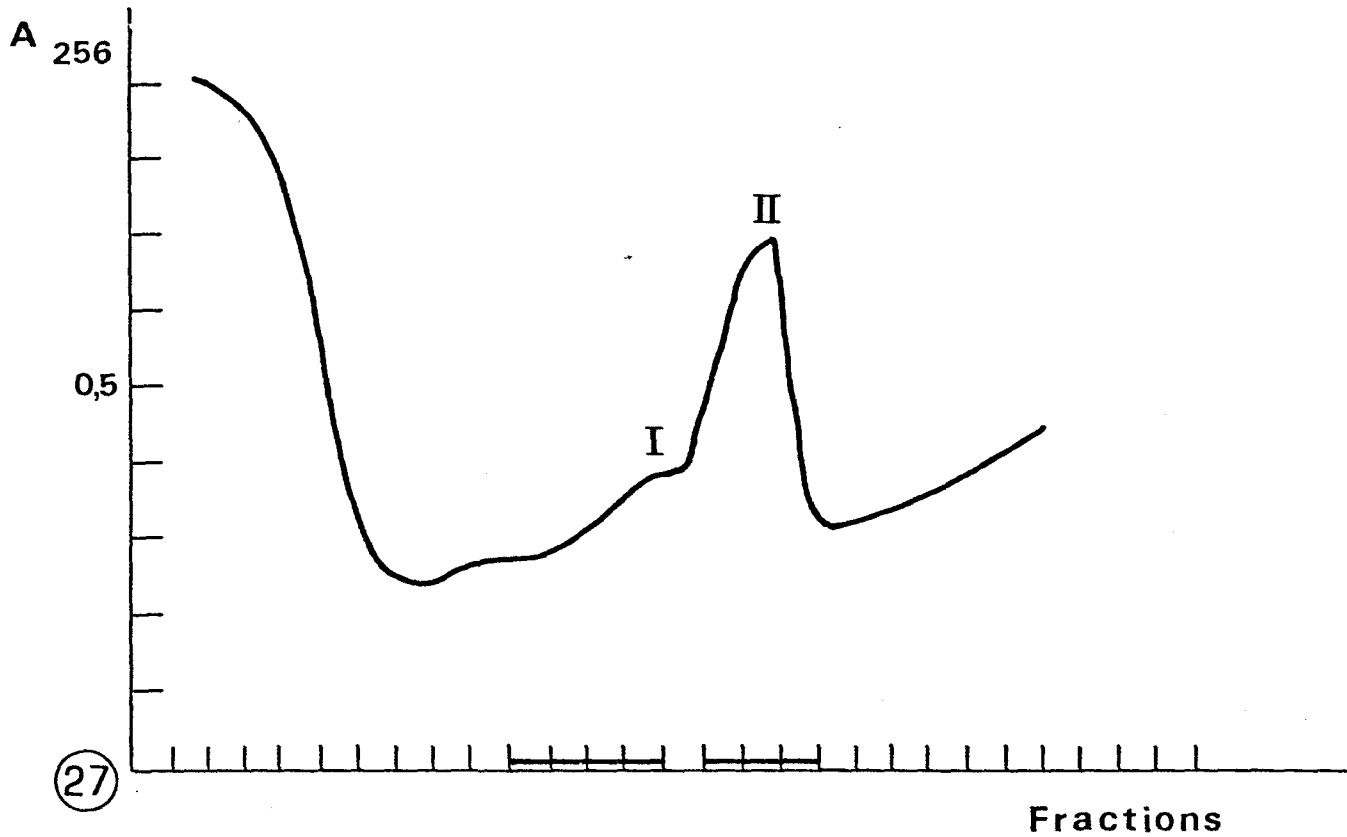
-Τα κενά σωματίδια έχουν μία φαινομενική πυκνότητα ίση με 1,28

-Τα πλήρη σωματίδια έχουν μία φαινομενική πυκνότητα ίση με 1,38

EIKONA 27

Εικ. 27. Καμπύλη της κατανομής της απορρόφησης στα 256nm γραμμικής βαθμιδωτής πυκνότητας διαλύματος σακχαρόζης, με Reovirus του δάκου.

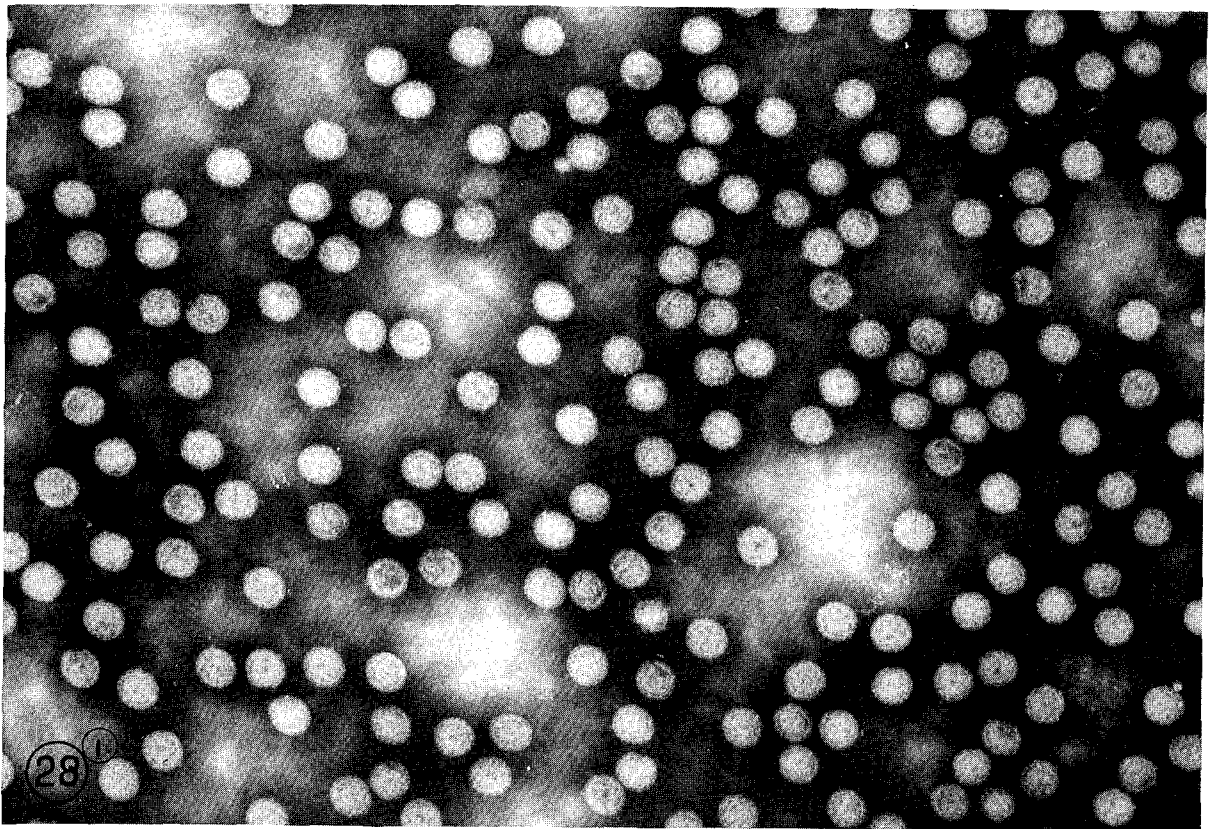
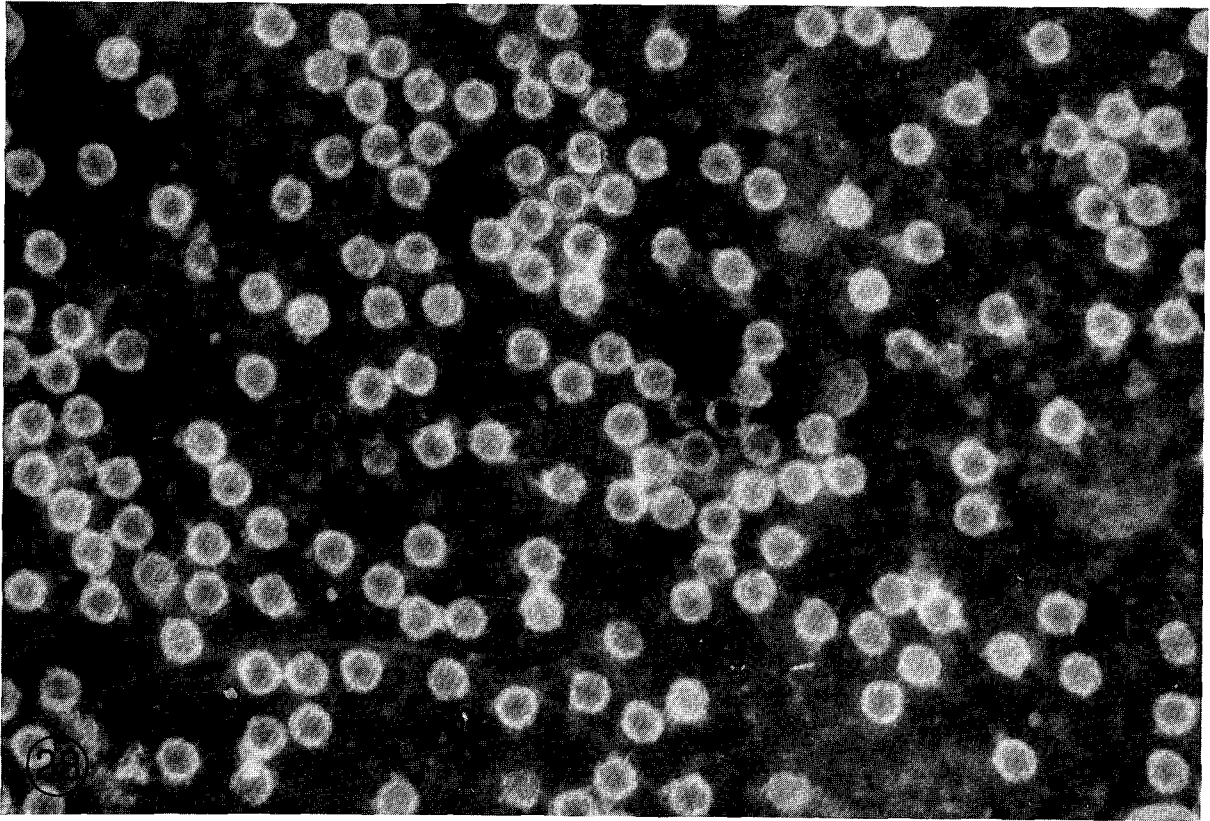
Εικ. 27¹. Καμπύλη της κατανομής της απορρόφησης με Reovirus του δάκου στα 256nm γραμμικής βαθμιδωτής πυκνότητας διαλύματος χλωριούχου Καΐσιου από δύο κλάσματα I και II της σακχαρόζης (Εικ. 27) αφού ελήφθησαν Ξανά μετά από διαπίδυση. Οι κορυφές αντιστοιχούν στα κενά (I) και στα πλήρη (II) σωματίδια.



EIKONA 28

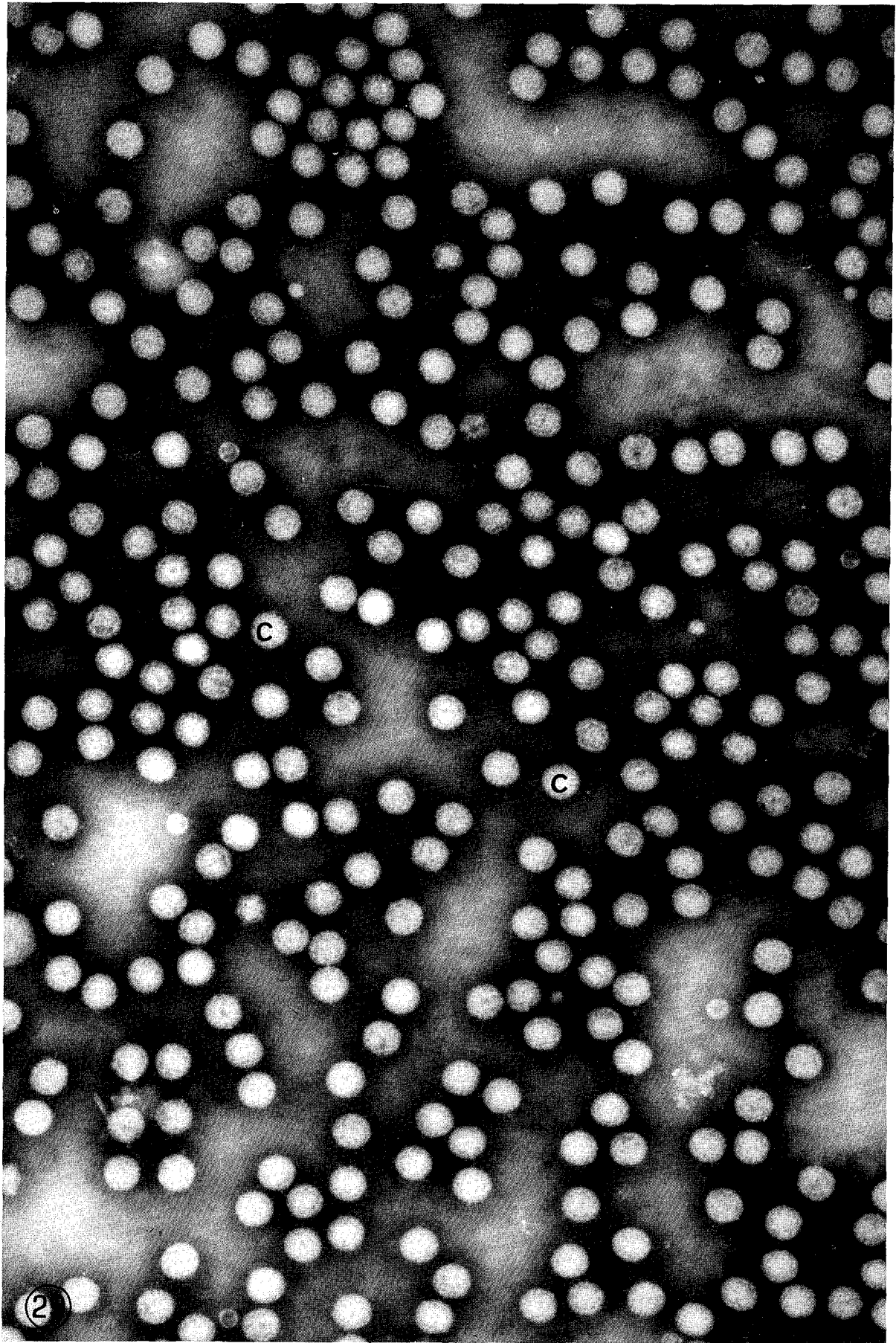
Εικ. 28. Αιώρημα με σωματίδια Reovirus κενά παρατηρούμενα μετά από αρνητική χρώση στο PTA.
x 100.000

Εικ. 281. Αιώρημα με ιολογικά σωματίδια Reovirus πλήρη παρατηρούμενα μετά από αρνητική χρώση στο PTA.
x 100.000



EIKONA 29

Εικ. 29. Αιώρημα ιολογικών σωματιδίων Reovirus παρατηρούμενο μετά από καθαρισμό και αρνητική χρώση στο PTA. Η εξωτερική στρώση που περιβάλλει το κεντρικό τμήμα "core" (C), σχηματίζεται από μία εξωτερική στρώση που αποτελείται από υποενότητες καθαρά διακρινόμενες. Όταν αυτές χαθούν, οι σωληνοειδείς αποφύσεις μοιάζουν να καταλαμβάνουν τις κορυφές ενός εικοσαέδρου.
x 150.000

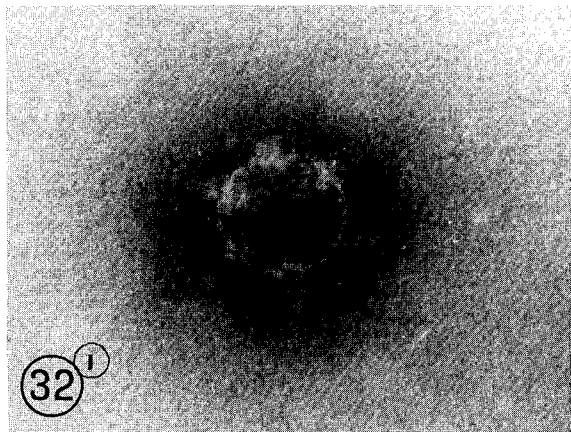
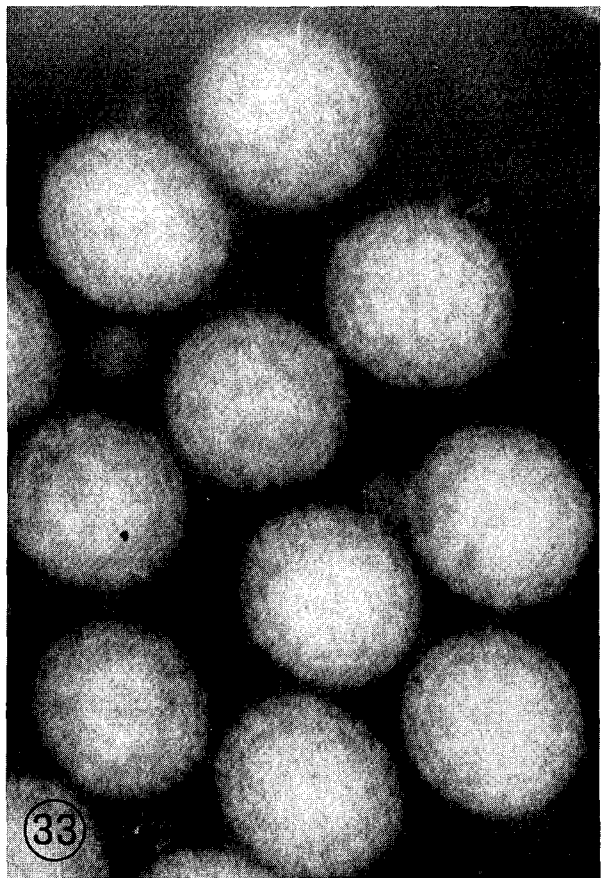
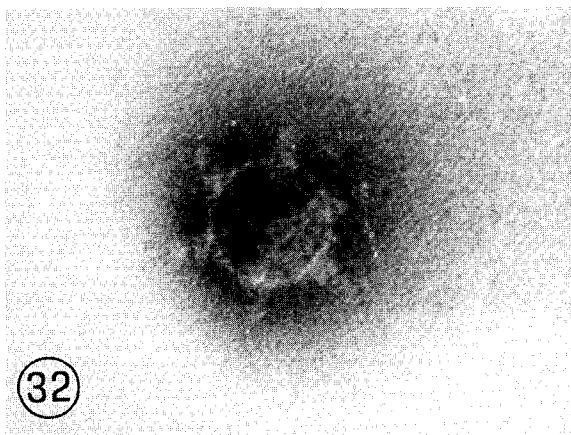
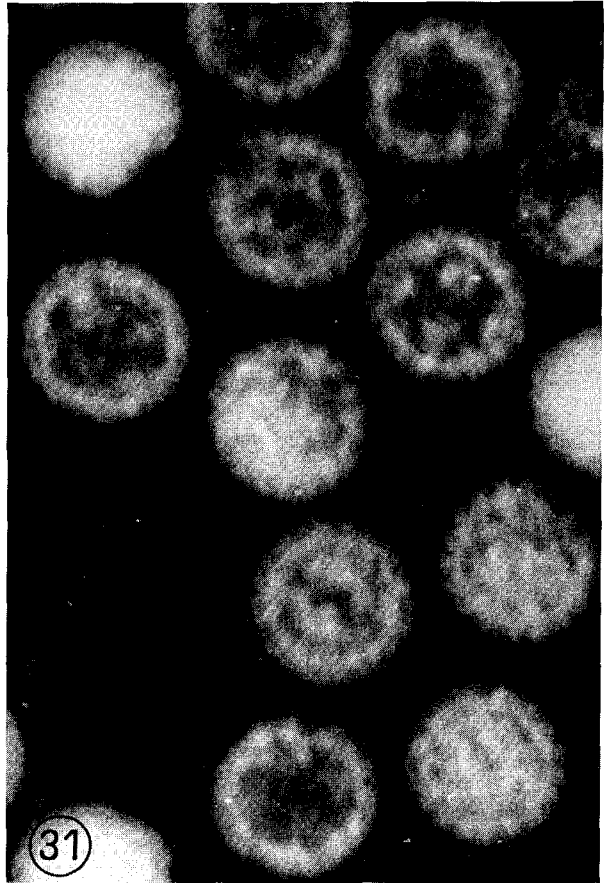
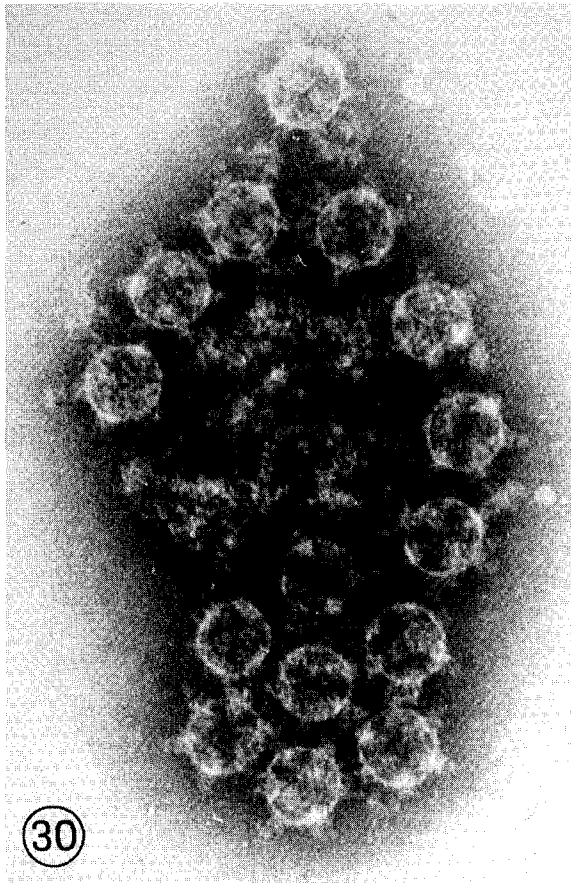


EIKONA 30

Εικ. 30,32,32¹. Αποδομημένα ιολογικά σωματίδια Reovirus που έχουν χάσει την εξωτερική τους στοιβάδα.
Η "core" διαθέτει σωληνοειδείς προεκτάσεις τοποθετημένες έτσι που να μοιάζουν ότι καταλαμβάνουν τις κορυφές ενός εικοσαέδρου.
εικ. 30 x 198.000
εικ. 32 x 336.000
εικ. 32¹ x 336.000

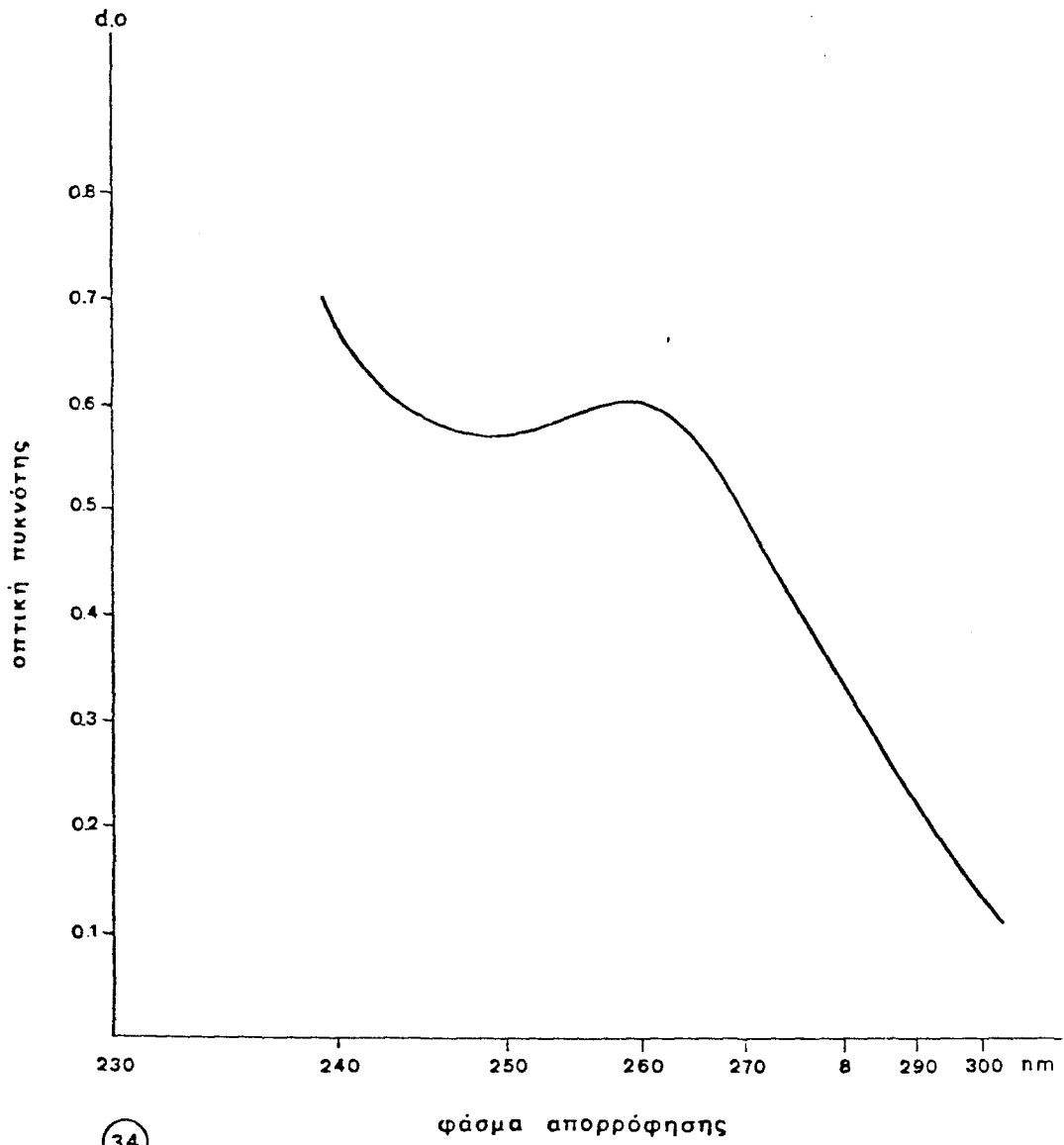
Εικ. 31. Ιολογικά σωματίδια Reovirus που έχουν διαβρωθεί από το ΡΤΑ, περιβαλλόμενα από μία εξωτερική στοιβάδα υποενοτήτων πάχους 10nm, διατεταγμένες σαν ένα φωτοστέφανο.
x 365.000

Εικ. 33. Ανέπαφα ιολογικά σωματίδια Reovirus, αποτελούμενα από ένα κεντρικό μέρος που σχηματίζουν ένα πυρήνα "core" και περιβάλλονται από μία εξωτερική στοιβάδα.
x 415.000



EIKONA 34

Εικ. 34. Γραφική παράσταση φάσματος απορρόφησης στο υπεριώδες φως αιωρήματος Reovirus του δάκου αφού έχει υποστεί καθαρισμό.



3.5.6. Βιοχημική ανάλυση των καθαρών βίριων

3.5.6.1. Φύση του νουκλεϊνικού οξέος

Ο προσδιορισμός του τύπου νουκλεϊνικού οξέος έγινε με χρωματομετρικές μεθόδους. Η θετική αντίδραση στην ορκινόλη και αρνητική στην διφαινυλαμίνη έδειξε ότι η φύση του ιολογικού γονιδιώματος είναι RNA (2.5.2.).

3.5.6.2. Ηλεκτροφορητική ανάλυση του γονιδιώματος

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους καθαρών ιών (Εικ. 35) έγινε ηλεκτροφορητική ανάλυση του γονιδιώματος. Πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροφορήσεις σε πήγμα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιώντας ως δείγμα για σύγκριση το RNA του ιού της κυτιοπλασμικής πολυέδρωσης του *Bombyx mori* προελεύσεως PAYNE (PAYNE and RIVERS, 1976).

Η κατανομή των ζωνών της ηλεκτροφόρησης του γονιδιώματος του Reovirus του δάκου, παρατηρούμενη μετά από χρώση σε Βρωμιούχο εθίδιο είναι τυπική ενός διπλονηματικού τεμαχισμένου RNA (Εικ. 36). Αναγνωρίζονται οκτώ ζώνες από τις οποίες 2 παρουσιάζουν μία πυκνότητα χρώσης πιο έντονη (ζώνες B και C). Είναι προφανές ότι οι δύο ζώνες αντιστοιχούν η κάθε μία σε δύο τεμάχια του RNA πολύ γειτονικού μοριακού βάρους.

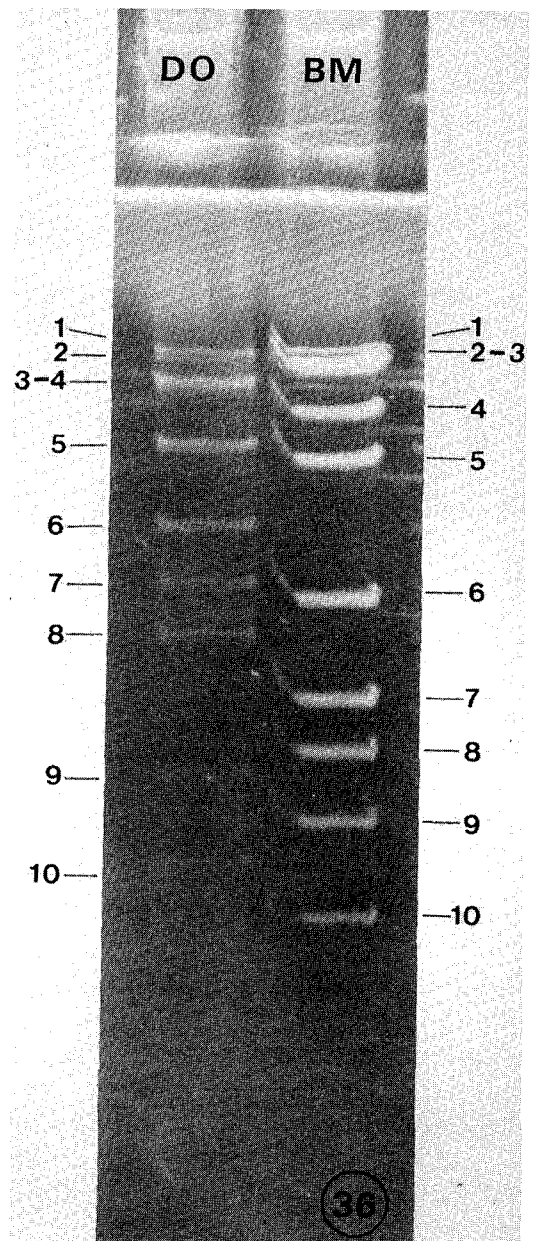
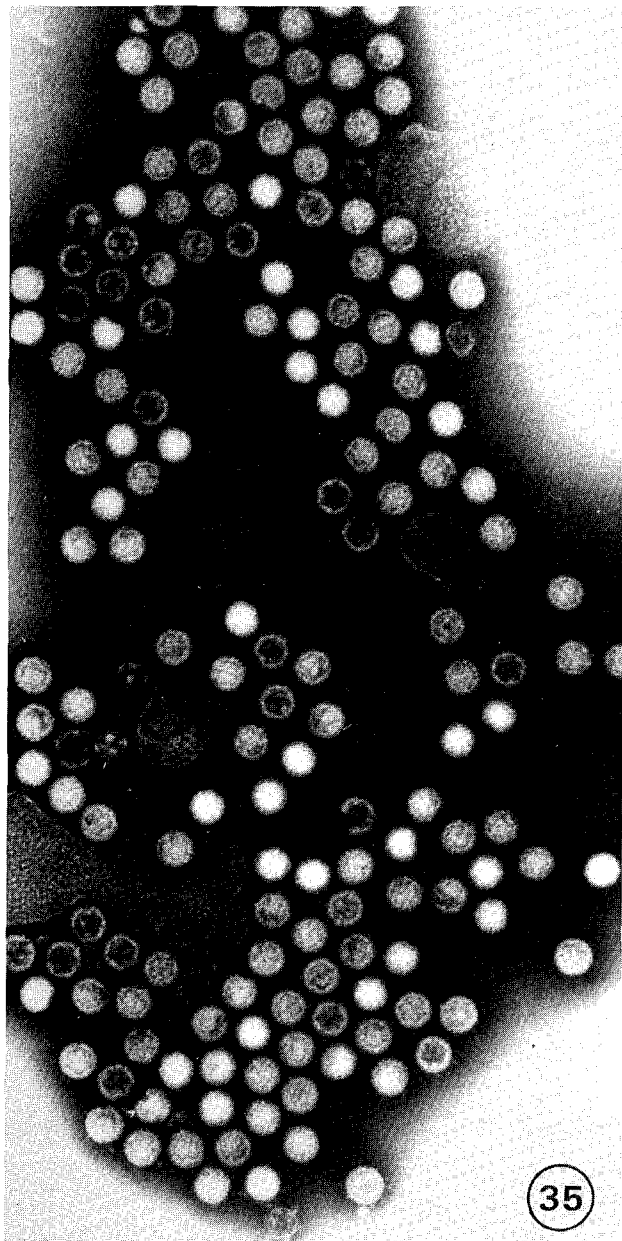
Μια τέτοια τοποθέτηση ανευρίσκεται στην περίπτωση του ιού της κυτιοπλασμικής πολυέδρωσης του *B. mori* στο επίπεδο της ζώνης 8 που δεν κατέστη δυνατό να διαλυθεί στα δύο συστατικά του.

Το μοριακό βάρος των τεμαχιδίων του ιού προσδιορίστηκε με σύγκριση τις αποστάσεις μετανάστευσης (Rf) με την αντίστοιχη μετανάστευση ιών γνωστού μοριακού βάρους. Μετρήσαμε με βάση μία ευθεία αναφοράς (Εικ. 37) που έχει συσταθεί φέροντας επάνω σε ημιλογαριθμικό χαρτί τις αποστάσεις της μετανάστευσης των τεμαχιδίων του RNA, του δείγματος προς σύγκριση, σε σχέση με γνωστά μοριακά βάρη όπως αυτά έχουν δημοσιευθεί από τους PAYNE και RIVERS (1976). Το συνολικό μοριακό βάρος του γονιδιώματος των ιών είναι $15,36 \cdot 10^6$ daltons. (ΠΙΝΑΚΑΣ IV).

EIKONA 35

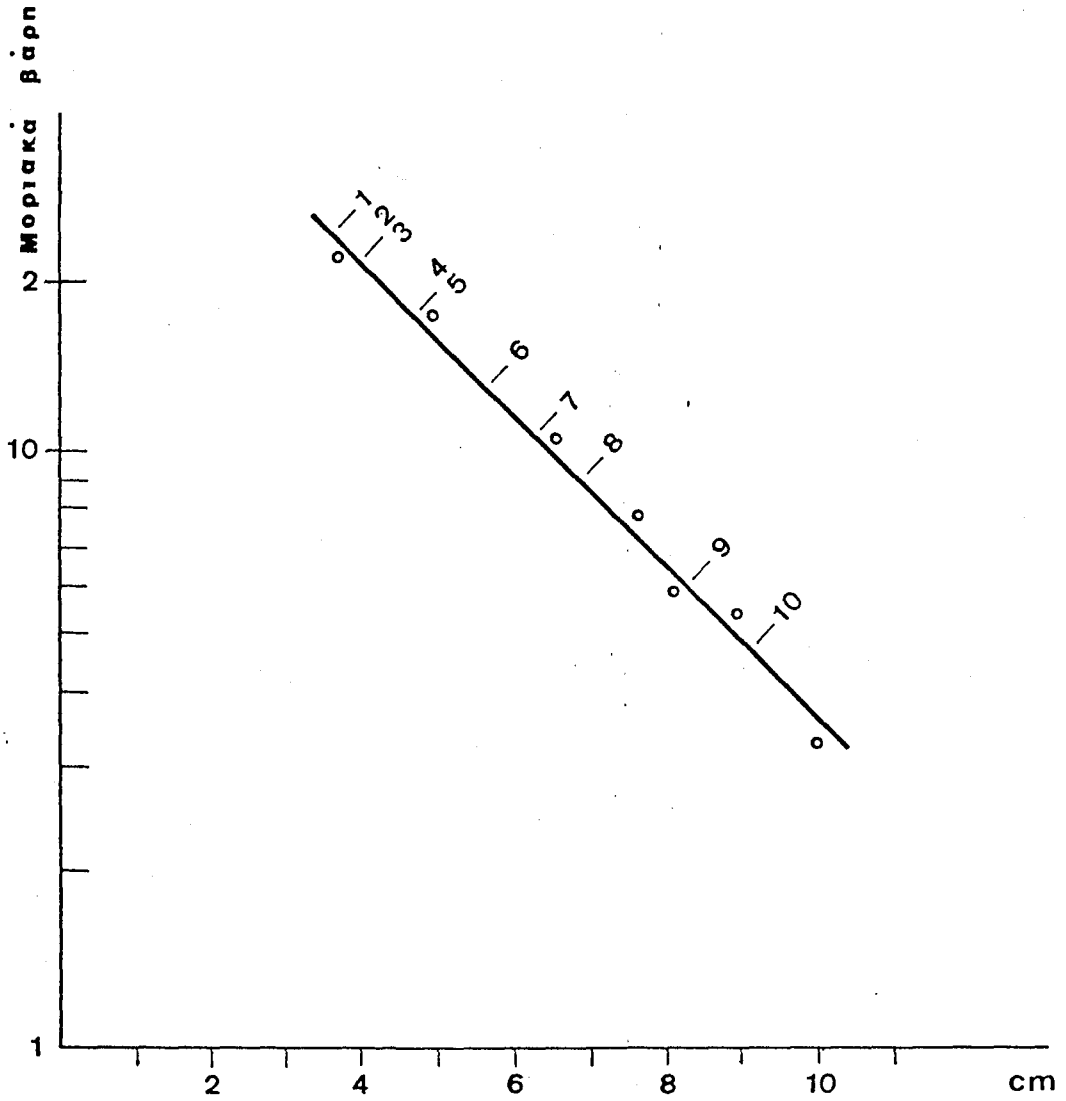
Εικ. 35. Αιώρημα ιολογικών σωματιδίων τύπου Reovirus μετά από καθαρισμό και αρνητική χρώση σε φωσφοροβολφραμικό οξύ. x 83.500

Εικ. 36. Ηλεκτροφορητική κατανομή RNA του Reovirus του δάκου και του Cyrovirus του *Bombyx mori* που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς. Πήγμα πολυακρυλαμίδης 7% κατά τη μέθοδο LAEMMLI (1970).



EIKONA 37

Εικ. 37. Ηλεκτροφορητική κινητικότητα τεμαχιδίων του RNA του Reovirus του δάκου σε σχέση με τεμαχίδια αναφοράς του Reovirus του *B. mori*.



ΠΙΝΑΚΑΣ IV

Μοριακά βάρη ($\times 10^6$ daltons) των τεμαχιδίων RNA από 2
 Reovirus εντόμων.

Cypovirus του *Bombyx mori* (PAYNE and RIVERS, 1976).

Ιοί του *Dacus oleae*

	Cypovirus <i>B. mori</i>	Virus <i>D. oleae</i>
1	2,55	2,49
2	2,42	2,25
3	2,32	2,25
4	2,03	1,90
5	1,82	1,90
6	1,12	1,40
7	0,84	1,16
8	0,62	0,96
9	0,56	0,60
10	0,35	0,45

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εργασία αυτή αναφέρεται στη διερεύνηση των παθολογικών σχέσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του δάκου της ελιάς και ιών. Τα αποτελέσματα της μελέτης επέτρεψαν μία πρώτη αξιολόγηση της παθογόνου δύναμης ιών, απέδειξαν ότι και το έντομο αυτό όπως και άλλα Δίπτερα προσβάλλεται από ιούς και για πρώτη φορά διαπιστώθηκε η ύπαρξη ιών σε φυσικούς πληθυσμούς από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Κατά τη διάρκεια εργασιών, στις οποίες έγιναν τεχνητές μολύνσεις με γνωστούς εντομοπαθογόνους ιούς αποδείχθηκε ότι τα έντομα του δάκου που προέρχονταν από φυσικούς πληθυσμούς περιείχαν ιολογικά σωματίδια διαφορετικά από εκείνα που είχαν μολυνθεί. Η μελέτη για την διαπίστωση ιών σε φυσικούς πληθυσμούς από διάφορες περιοχές της Ελλάδας αποκάλυψε την ύπαρξη τριών τύπων ιολογικών παρασφαιρικών σωματιδίων διαμέτρου 60, 40 και 30 nm. Από την εξέταση μεγάλου αριθμού δειγμάτων εντόμων προέκυψε ότι οι ιοί αυτοί βρίσκονται σε πληθυσμούς εντόμων από διάφορες περιοχές αρκετά απομακρυσμένες και οι οποίες καλύπτουν διάφορα γεωγραφικά διαμερίσματα και οικοσυστήματα. Απαντούν τόσο στην ηπειρωτική όσο και στη νησιωτική Ελλάδα, φανερώνοντας έτσι μία ευρεία γεωγραφική εξάπλωση. Ο ρόλος που διαδραματίζουν οι ιοί αυτοί και οι επιπτώσεις που έχουν οι μολύνσεις των εντόμων στην διακύμανση των πληθυσμών του σοβαρού αυτού εχθρού της ελιάς είναι αντικείμενο παραπέρα έρευνας με απώτερο σκοπό την διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης των παθογόνων αυτών για την βιολογική αντιμετώπιση του δάκου.

Από τους ιούς που βρέθηκαν στους φυσικούς πληθυσμούς, εκείνος που έχει διάμετρο 60nm έγινε αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης τόσο από την άποψη της παθολογίας, όσο και ως προς το χαρακτηρισμό της δομής του (βίριον). Από πειράματα μόλυνσης υγιών ακμαίων εντόμων που έγιναν με τη μέθοδο της έγχυσης ή της *per os* μόλυνσης με τον παραπάνω ιό, παρατηρήθηκε μία αυξημένη θνησιμότητα 97% και 93% αντίστοιχα μέσα σε 16 ημέρες, γεγονός που δείχνει την ισχυρή παθογόνο δύναμη του ιού. Η αποτελεσματικότητα της δράσης αυτού του ιού στους φυσικούς πληθυσμούς είναι δύσκολο να εκτιμηθεί και οι συγκριτικές μελέτες της βιοσιμότητας και της ωπαραγωγής σε πληθυσμούς του δάκου που έχουν ή που είναι απαλλαγμένοι από ιούς, θα πρέπει να αποτελέσουν αντικείμενο περαιτέρω έρευνας.

Η εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υπερλεπτών τομών ιστών προσβεβλημένων ατόμων, έδειξε έναν έντονο πολλαπλασιασμό του ιού που γίνεται μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου. Η παρατήρηση των ενδοκυττοπλασμικών ιοπλασμάτων που είναι καθαρά διαφοροποιημένα, διαμέσου των οποίων γίνονται οι συγκεντρώσεις των βίριον και οι παρακρυσταλλικές διατάξεις του

ιού του δάκου είναι τόσο χαρακτηριστικές που κατατάσσονται στους Reovirus των ζώων. Πράγματι οι ιοί αυτοί έχουν μία επιλεκτική ιδιότητα να προτιμούν τα επιθηλιακά κύτταρα, στα οποία προσηλώνονται αυστηρά όπως οι Rotavirus των σπονδυλωτών (SCHERRER et al., 1976).

Οι παρατηρήσεις του εντοπισμού των ιών στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου και η ανεύρεση τους στα αποχωρήματα του δάκου, έχουν μεγάλο ενδιαφέρον από την άποψη της οικολογίας του ιού και μάλιστα στα πλαίσια που αυτές αναφέρονται στη δυνατότητα καθέτου (από γενεά σε γενεά) και οριζοντίως (από άτομο σε άτομο) μετάδοσης των ιολογικών μολύνσεων.

Η εξέταση των αιωρημάτων που έχουν υποστεί κάθαρση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ότι τα βίριον διαθέτουν ένα διπλό καψίδιο, όπως μερικών Reovirus και μερικών Rotavirus της οικογένειας Reoviridae. (DERBYSHIRE and WOOD, 1978).

Αποδείχθηκε ότι το νουκλεϊνικό οξύ του ιού είναι RNA, με την ειδική χημική αντίδραση (χρώση με ορκινόλη). Η φύση του γονιδιώματος που παρουσιάζεται τετμημένο στην ηλεκτροφορητική του ανάλυση επιβεβαιώνει την ομοιότητα μεταξύ του ιού του δάκου, με τους Reovirus. Η παρουσία των 10 τμημάτων του διπλονηματικού RNA αποτελεί επιβεβαίωση της ομοιογένειας του αριθμού των τμημάτων που έχουν οι Reovirus στα ασπόνδυλα. Εν τούτοις η ουσιώδης διαφορά με τους ιούς της κυττοπλασμικής πολυέδρωσης έγκειται στην απουσία των εγκλειστων σωματίων. Από αυτή την άποψη ο ιός που μελετήθηκε μοιάζει με του ιούς P του *Drosophila melanogaster* και του ιού I του *Ceratititis capitata*, οι οποίοι επίσης στερούνται εγκλειστων σωματίων και των οποίων το γονιδίωμα είναι πολύ συγγενές ηλεκτροφορητικά. (PLUS et al., 1981). Από τη σύγκριση των μοριακών βαρών των τμημάτων του γονιδιώματος του ιού του δάκου και εκείνων του *C. capitata*, είδους συγγενούς ταξινομικά, με ηλεκτροφορητική ανάλυση, προκύπτουν αξιοσημείωτες διαφορές σε πολλά τμήματα του γονιδιώματος. Το γεγονός αυτό μας αποδεικνύει ότι πρόκειται καθαρά για δύο διαφορετικούς ιούς.

Όσον αφορά στους άλλους δύο μικρότερους ιούς που εντοπίζονται σε αρκετά δείγματα από πληθυσμούς δάκου διαφόρων προελεύσεων, η μελέτη τους περιορίστηκε ως προς τη μορφολογία με παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και έγινε σύγκριση με παρόμοιους γνωστούς ιούς, ώστε να γίνει μία πρώτη προσέγγιση ως προς τον προσδιορισμό τους. Έτσι, ο ιός των 40nm θυμίζει από το μέγεθός του και την αρχιτεκτονική του εκείνους που έχει περιγράψει ο MOUSSA (1976) στο *D. tryoni* και πιο γενικά εκείνους της ομάδας Nudaurella (MATTHEWS, 1982). Ως προς τους ιούς με σωματίδια των 30nm διάμετρο, η ομοιότητα με τους Picornavirus είναι προφανής, αλλά αυτό το κριτήριο δεν αρκεί για να τους κατατάξουμε στην ομάδα αυτών των ιών. Όπως και στους Reovirus, το αποτέλεσμα της δράσης των μικρών αυτών ιών

στους πληθυσμούς του δάκου, θα πρέπει να γίνει αντικείμενο μιας περαιτέρω έρευνας.

Οι πειραματικές μολύνσεις των ακμαίων του δάκου με τους ιούς που απομονώθηκαν από άλλα έντομα, έδειξε ότι ο δάκος της ελιάς είναι ευαίσθητος σε πολλούς από αυτούς. Έτσι από τους 8 ιούς που δοκιμάστηκαν οι 4 προκάλεσαν μόλυνση. Ο Picornavirus CrPV και ο Iridovirus CIV βρέθηκαν ειδικά δραστήριοι, διότι θανατώνουν το 85% των εντόμων σε 3 και 7 ημέρες αντίστοιχα, όταν αυτοί χορηγούνται από την ενδοκοιλιακή οδό με έγχυση. Η υπερμικροσκοπική μελέτη της δομής αυτών των μολύνσεων έδειξε ένα πολυποίκιλο τρόπο μόλυνσης των κυριότερων οργάνων του σώματος των ακμαίων εντόμων. Αυτές οι πειραματικές μολύνσεις δείχνουν ότι οι δυνατότητες αυτών των ιών στο ρόλο του ρυθμιστικού παράγοντα των πληθυσμών του δάκου χρειάζονται περισσότερη διερεύνηση για την ουσιαστική τους αξιολόγηση.

Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας συμβάλλουν στην καλύτερη γνώση της παθολογίας του δάκου ενός από τους κυριότερους εχθρούς της ελιάς στη χώρα μας και δημιουργούν νέα αντικείμενα ερευνητικού ενδιαφέροντος.

ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

Η αντιστοιχία των ξένων επιστημονικών όρων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία με τους ελληνικούς βασίστηκε στα εξής βοηθήματα:

1. *Λεξικό φυτοπαθολογικών Όρων*. ΖΑΧΟΣ, Δ. και συνεργ. 1984. Εκδ. Ελληνική φυτοπαθολογική Εταιρεία.
2. *Πεντάγλωσσο Λεξικό Επιστημονικών Όρων*. ΘΩΜΗΣ Γ. 1981. Εκδ. Τεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδος.
3. *Μαθήματα Γενικής Βιολογίας*. ΚΡΙΜΠΑ, Κ., ΚΑΛΟΠΙΣΗ, Ι., 1988. Εκδ. Οργανισμός Εκδόσεως Διδακτικών Βιβλίων.
4. *Dictionary of Scientific and Technical Terms*. S. PARKER edit. 1984. MCGRAW-HILL BOOK COMPANY, N.Y.
5. *Terms Used in Invertebrate Pathology in Five Languages: English, French, German, Italian, Spanish*. MARTIGNONI, M. και συνεργ. 1981, U.S. Depart. of Agriculture.
6. *Genes*. BENJAMIN LEWIN, 1988. *Medecine - Sciences*. FLAMMARION. Paris
7. *Dictionnaire de Termes Techniques d'Entomologie Elementaire*. SEGUY, E. 1967. Edit LECHEVALIER - Paris.
8. *A Dictionary of Entomology*. LEFTWICH, A., 1977. Edit CONSTABLE, London.

Οι έννοιες των παρακάτω επιστημονικών όρων περιέχονται στο *Λεξικό φυτοπαθολογικών Όρων*:

απομόνωση ιού (virus isolation)
ασθένεια (disease)
ασθένεια μολυσματική (infectious disease)
βιοδοκιμή (bio-assay)
βίριον (virion)
έγκλειστα (inclusion bodies)
εμβολιασμός (inoculation)
ένεση (injection)
ευαισθησία (sensitivity)
ευπάθεια (susceptibility)
ινίδια (fimbriae)
ιολογία (Virology)
ιολογική ομάδα (virus group)
ιολογικό νουκλεϊνικό οξύ, διπλονηματικό (double stranded viral RNA or DNA)
ιολογικό νουκλεϊνικό οξύ, μονονηματικό (single stranded viral RNA or DNA)
ιολογικό φυγοκεντρικό ίζημα (virus pellet)
ιοπλάσματα (viroplasmms)
ιός (virus)
ιού αναπαραγωγή (virus replication, virus multiplication)
ιού απομόνωση (virus isolation)

ιού δομή (virus structure)
ιού κάθαρση (virus purification)
ιών σωματίδια (virus particles)
ιών σωματίδια ισομετρικά (isometric virus particles)
ιών σωματίδια πολυεδρικά (polyhedral virus particles)
ιών σωματίδια σφαιρικά (sphaerical virus particles)
ίωση (virosis, virus disease)
καψίδιο (capsid)
καψομέρη (capsomeres)
μη παθογόνος (avirulent, non virulent)
μόλυνση (infection)
μόλυσμα (inoculum)
μολυσματική ικανότητα (infectivity)
μολυσματικός (infective)
μολυσμένος (infected)
μορφή (form)
νουκλεοκαψίδιο (nucleocapsid)
ορολογία (serology)
ορότυπος (serotype)
παθογένεση (pathogenesis)
παθογόνο (pathogen)
παθογόνος δύναμη (virulence)
παθογόνος ικανότητα (pathogenicity)
παράσιτο (parasite)
σύμπτωμα (symptom)
υπομονάδες πρωτεΐνης (protein subunits)
φυλή (race)

Οι μονάδες που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση μεγεθών είναι:

1 μ m = 10⁻⁶m, αντιστοιχία και ονοματολογικό πρόθεμα micro-
1nm = 10⁻⁹m, αντιστοιχία και ονοματολογικό πρόθεμα nano-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ
ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΩΝ ΔΙΠΤΕΡΩΝ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΩΝ ΔΙΠΤΕΡΩΝ

<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	131
1. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΔΙΠΤΕΡΩΝ.....	132
2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΙΩΣΕΩΝ.....	138
2.1. BACULOVIRUS.....	138
Πυρηνική πολυέδρωση του <i>Tipula paludosa</i>	138
" " " <i>Aedes sollicitans</i>	139
" " " <i>Aedes triseriatus</i>	139
" " " <i>Wyoemya smithii</i>	139
" " " <i>Anopheles subpictus</i>	140
" " " <i>Rhynchosciara angelae</i>	140
" " " <i>Merodon equestris</i>	140
2.2. ENTOMOPOXVIRUS.....	140
Entomopoxvirus του <i>Camptochironomus tentans</i>	140
" " " <i>Chironomus luridus</i>	141
" " " <i>Chironomus attenuatus</i>	141
2.3. IRIDOVIRUS.....	142
Iridovirus του <i>Tipula paludosa</i>	142
" " " <i>Aedes taeniorhynchus</i>	143
2.4. DENSOVIRUS.....	144
Densovirus του <i>Aedes aegyptii</i>	144
" " " <i>Simulium vittatum</i>	144
2.5. REOVIRUS.....	144
Reovirus με εγκλειστικά σωματίδια.....	145
" μη εγκλεισμένοι.....	145
2.6. PICORNAVIRUS.....	146
Picornavirus της δροσόφιλα.....	146
2.7. ΑΛΛΟΙ ΜΙΚΡΟΙ ΙΟΙ ΜΕ RNA.....	146
Ιοί RS της δροσόφιλας.....	147
Ιοί CIV του <i>Dacus tryoni</i>	147
Ιοί του <i>Nodamura</i>	148
2.8. BIRNAVIRUS.....	148
Ιοί X της δροσόφιλας.....	148
Birnavirus των Culicoidae.....	148

ΟΙ ΙΟΙ ΤΩΝ ΔΙΠΤΕΡΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία 25 χρόνια, λόγω της σημασίας που έχουν τα Δίπτερα έντομα, τόσο στη γεωργία όσο και στην ανθρώπινη και ζωϊκή ιατρική, έχουν γίνει πολυάριθμες μελέτες στη μικροβιακή παθολογία τους.

Από γεωργικής άποψης τα έντομα αυτά προκαλούν σημαντική μείωση της παραγωγής σε διάφορες καλλιέργειες ή υποβάθμιση της ποιότητας των παραγομένων προϊόντων. Οσον αφορά στην ανθρώπινη και ζωϊκή ιατρική, τα έντομα αυτά είναι φορείς μεταδοτικών ασθενειών όπως του κιτρίνου πυρετού, των εγκεφαλίτιδων, της πολιομυελίτιδας και άλλων ή προκαλούν δευτερογενείς μολύνσεις π.χ. μυϊάσεις.

Οι ιολογικές μελέτες που αφορούν στην Παθολογία των διπτέρων, έχουν ως σκοπό τον εντοπισμό ιώσεων τόσο για τις επιδημιολογικές μελέτες, όσο και την ανεύρεση τρόπων βιολογικής αντιμετώπισης των εχθρών αυτών με τη χρησιμοποίηση παθογόνων ιών.

Οι MARTIGNONI και IWAI (1986) στους καταλόγους των ιολογικών ασθενειών των εντόμων που έχουν συντάξει, καταγράφουν περισσότερα από 230 είδη διπτέρων στα οποία έχει επισημανθεί ιολογική προσβολή. Ο κατάλογος που ακολουθεί είναι βασισμένος στους παραπάνω συγγραφείς αφού έγινε επιλογή των διπτέρων και κατάταξη κατά τύπους ιώσεων. Σε κάθε τύπο ιώσεως αναγράφονται το γένος, το είδος και η οικογένεια των εντόμων που έχει επισημανθεί η συγκεκριμένη ίωση.

1. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΔΙΠΤΕΡΩΝ (ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΤΟΝ ΚΑΤΑΛΟΓΟ ΤΩΝ MARTIGNONI, M.E. and IWAI, P.J. 1986)

CO₂ sensitivity

<i>Anopheles stephensi</i>	-Culicidae
<i>Culex pipiens</i>	- "
<i>C. pipiens quinquefasciatus</i>	- "
<i>Toxorhynchites amboinensis</i>	- "
<i>Drosophila affinis</i>	-Drosophilidae
<i>D. algonquin</i>	- "
<i>D. athabasca</i>	- "
<i>D. azteca</i>	- "
<i>D. busckii</i>	- "
<i>D. funebris</i>	- "
<i>D. gibberosa</i>	- "
<i>D. hydei</i>	- "
<i>D. inmigrans</i>	- "
<i>D. macrospina</i>	- "
<i>D. macrospina limpiensis</i>	- "
<i>D. melanogaster</i>	- "
<i>D. pallidipennis</i>	- "
<i>D. prosaltans</i>	- "
<i>D. pseudoobscura</i>	- "
<i>D. repleta</i>	- "
<i>D. robusta</i>	- "
<i>D. simulans</i>	- "
<i>D. tolteca</i>	- "
<i>D. willistoni</i>	- "
<i>Musca domestica</i>	-Muscidas
<i>Ceratitis capitata</i>	-Tephritidae

Cytoplasmic polyhedrosis

<i>Culicoides sp.</i>	-Ceratopogonidae
<i>Chironomus plumosus</i>	-Chironomidae
<i>Goeldichironomus holoprasinus</i>	- "
<i>Aedes aegypti</i>	-Culicidae
<i>A. cantator</i>	- "
<i>A. sierrensis</i>	- "
<i>A. sollicitans</i>	- "
<i>A. sticticus</i>	- "
<i>A. taeniorhynchus</i>	- "
<i>A. thibaulti</i>	- "
<i>A. triseriatus</i>	- "

<i>Anopheles bradleyi</i>	-	"
<i>A. crucians</i>	-	"
<i>A. freeborni</i>	-	"
<i>A. quadrimaculatus</i>	-	"
<i>Culex erraticus</i>	-	"
<i>C. peccator</i>	-	"
<i>C. pipiens</i>	-	"
<i>C. pipiens pipiens</i>	-	"
<i>C. restuans</i>	-	"
<i>C. salinarius</i>	-	"
<i>C. tarsalis</i>	-	"
<i>C. territans</i>	-	"
<i>Culiseta inornata</i>	-	"
<i>C. melanura</i>	-	"
<i>Orthopodomyia signifera</i>	-	"
<i>Psorophora confinnis</i>	-	"
<i>P. ferox</i>	-	"
<i>Uranotaenia sapphirina</i>	-	"
<i>Cnephia mutata</i>	-	"
<i>Prosimulium mixtum</i>	-	"
<i>P. mixtum fuscum</i>	-	"
<i>Simulium argyraetum</i>	-	"
<i>S. aureum</i>	-	"
<i>S. tuberosum</i>	-	"
<i>S. venustum</i>	-	"
<i>S. vittatum</i>	-	"

-Simuliidae

Densonucleosis

<i>Aedes aegypti</i>	-	Culicidae
<i>A. albopictus</i>	-	"
<i>A. cantans</i>	-	"
<i>A. cinereus</i>	-	"
<i>A. dorsalis</i>	-	"
<i>A. geniculatus</i>	-	"
<i>A. vexans</i>	-	"
<i>Culex pipiens pipiens</i>	-	"
<i>Culiseta annulata</i>	-	"
<i>Simulium vittatum</i>	-	Simuliidae

Iridescent virosis

<i>Biblio marci</i>	-	Bibionidae
<i>Calliphora vomitoria</i>	-	Calliphoridae
<i>Bezzia pygmaea</i>	-	Ceratopogonidae

<i>Culicoides arboricola</i>	- "
<i>C. clastrieri</i>	- "
<i>C. cubitalis</i>	- "
<i>C. odibilis</i>	- "
<i>C. sp.</i>	- "
<i>Corethrella appendiculata</i>	-Chaoboridae
<i>C. brakeleyi</i>	- "
<i>Mochlonyx velutinus</i>	- "
<i>Chironomus plumosus</i>	-Chironomidae
<i>Aedes aegypti</i>	-Culicidae
<i>A. albopictus</i>	- "
<i>A. annulipes</i>	- "
<i>A. cantans</i>	- "
<i>A. caspius</i>	- "
<i>A. caspius caspius</i>	- "
<i>A. cataphylla</i>	- "
<i>A. detritus</i>	- "
<i>A. dorsalis</i>	- "
<i>A. excrucians</i>	- "
<i>A. flavescens</i>	- "
<i>A. fulvus pallens</i>	- "
<i>A. sierrensis</i>	- "
<i>A. sollicitans</i>	- "
<i>A. sticticus</i>	- "
<i>A. stimulans</i>	- "
<i>A. stramineus</i>	- "
<i>A. taeniorhynchus</i>	- "
<i>A. vexans</i>	- "
<i>Anopheles albimanus</i>	- "
<i>A. quadrimaculatus</i>	- "
<i>Culex peccator</i>	- "
<i>C. pipiens quinquefasciatus</i>	- "
<i>C. salinarius</i>	- "
<i>C. territans</i>	- "
<i>Culiseta annulata</i>	- "
<i>C. inornata</i>	- "
<i>C. melanura</i>	- "
<i>C. morsitans</i>	- "
<i>Psorophora confinnis</i>	- "
<i>Psorophora ferox</i>	- "
<i>P. horrida</i>	- "
<i>P. varipes</i>	- "
<i>Odagmia ornata</i>	-Simuliidae
<i>Simulium callidum</i>	- "
<i>S. earlei</i>	- "
<i>S. metallicum</i>	- "
<i>S. ornatum</i>	- "
<i>S. sp.</i>	- "
<i>S. virgatum</i>	- "
<i>Exorista sorbillans</i>	-Tachinidae
<i>Tipula livida</i>	-Tipulidae

T. oleracea - "
T. paludosa - "

Malaya disease

Aedes albopictus -Culicidae

Nuclear polyhedrosis

Calliphora vomitoria -Calliphoridae
Chironomus tentans -Chironomidae
Aedes aegypti -Culicidae
A. annandalei - "
A. atropalpus - "
A. epactius - "
A. nigromaculis - "
A. scutellaris - "
A. sollicitans - "
A. taeniorhynchus - "
A. tormentor - "
A. triseriatus - "
Anopheles crucians - "
Culex pipiens quinquefasciatus - "
Culex salinarius - "
Eretmapodites quinquevittatus - "
Psorophora confinnis - "
P. ferox - "
P. varipes - "
Toxorhynchites brevipalpis - "
Uranotaenia sapphirina - "
Wyeomyia smithii - "
Rhynchosciara angelae -Sciaridae
R. hollaenderi - "
R. milleri - "
Ugomyia sericariae - "
Tipula paludosa -Tipulidae

Other nonoccluded-virus diseases

Calliphora sp. -Calliphoridae
Phormia sp. - "
Cylicoides cavaticus -Ceratopogonidae

<i>Chaoborus crystallinus</i>	-Chaoboridae
<i>Chaetocoelopa sydneyensis</i>	-Coelopidae
<i>Aedes aegypti</i>	-Culicidae
<i>A. albopictus</i>	- "
<i>A. dorsalis</i>	- "
<i>A. melanimon</i>	- "
<i>A. taeniorhynchus</i>	- "
<i>A. triseriatus</i>	- "
<i>Anopheles stephensi</i>	- "
<i>Culex tarsalis</i>	- "
<i>Culiseta inornata</i>	- "
<i>Toxorhynchites amboinensis</i>	- "
<i>Drosophila ananassae</i>	-Drosophilidae
<i>D. erecta</i>	- "
<i>D. hydei</i>	- "
<i>D. inmigrans</i>	- "
<i>D. malerkotliana</i>	- "
<i>D. mauritania</i>	- "
<i>D. melanogaster</i>	- "
<i>D. montium</i>	- "
<i>D. nasuta</i>	- "
<i>D. nebulosa</i>	- "
<i>D. paulistorum</i>	- "
<i>D. simulans</i>	- "
<i>D. teissieri</i>	- "
<i>D. virilis</i>	- "
<i>D. willistoni</i>	- "
<i>D. yakuba</i>	- "
<i>Zaprionus tuberculatus</i>	- "
<i>Musca domestica</i>	-Muscidae
<i>Merodon equestris</i>	-Syrphidae
<i>Ceratitis capitata</i>	-Tephritidae

Other occluded-virus diseases

<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	-Culicidae
<i>Dacus tryoni</i>	-Tephritidae

Polyhedrosis, not further identified as cytoplasmic or nuclear

<i>Calliphora vomitoria</i>	-Calliphoridae
<i>Contarinia tritici</i>	-Cecidomyiidae
<i>Sitodiplosis mosellana</i>	- "

Presumed virosis

<i>Chironomus tentans</i>	-Chironomidae
<i>Goeldichironomus holoprasinus</i>	- "
<i>Coelopa frigida</i>	-Coelopidae
<i>Aedes aegypti</i>	-Culicidae
<i>A. pseudoscutellaris</i>	- "
<i>A. triseriatus</i>	- "
<i>Anopheles subpictus</i>	- "
<i>Culex restuans</i>	- "
<i>C. salinarius</i>	- "
<i>C. tarsalis</i>	- "
<i>C. territans</i>	- "
<i>Orthopodomyia signifera</i>	- "
<i>Psorophora confinnis</i>	- "
<i>Uranotaenia sapphirina</i>	- "
<i>Drosophila bifasciata</i>	-Drosophilidae
<i>D. melanogaster</i>	- "
<i>D. paulistorum</i>	- "
<i>D. pseudoobscura</i>	- "
<i>D. virilis</i>	- "
<i>D. willistoni</i>	- "
<i>Glossina fuscipes fuscipes</i>	-Muscidae
<i>G. morcitans centralis</i>	- "
<i>G. morcitans morcitans</i>	- "
<i>G. pallidipes</i>	- "
<i>Rhynchosciara angelae</i>	- "

Spheroidosis, insect pox

<i>Chironomus attenuatus</i>	-Chironomidae
<i>C. decorus</i>	- "
<i>C. luridus</i>	- "
<i>C. tentans</i>	- "
<i>Goeldichironomus holoprasinus</i>	- "
<i>Aedes aegypti</i>	-Culicidae
<i>A. flavescens</i>	- "
<i>Anopheles albimanus</i>	- "
<i>Culex pipiens molestus</i>	- "

2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΙΩΣΕΩΝ

Στα πλαίσια αυτής της ανασκόπησης δεν είναι δυνατόν να γίνει μία παρουσίαση που να εξαντλεί το θέμα για όλα τα βίριον που έχουν παρατηρηθεί στα δίπτερα. Μόνο οι κυριώτερες ομάδες των ιών που παρασιτούν στα έντομα θα παρουσιαστούν παρακάτω, παίρνοντας τα πλέον σημαντικά παραδείγματα για κάθε ομάδα.

2.1. BACULOVIRUS

Πυρηνική πολυέδρωση του *Tipula paludosa*

Η ασθένεια αυτή ανακαλύφθηκε από τον RENNIE το 1923 και παρουσιάζει μία ιδιαιτερότητα σε σχέση με τις ασθένειες αυτού του τύπου που έχουν περιγραφεί στα λεπιδόπτερα και τα υμενόπτερα. Η πολυέδρωση χαρακτηρίζεται από την ιδιότητα να εντοπίζεται η μόλυνση στα απομονωμένα αιμοκύτταρα και από την παρουσία πολυέδρων σχήματος μισοφέγγαρου. Οι ήδη παλαιές εργασίες των SMITH και XEROS (1954), σχετικά με την υπερμικροσκοπική δομή τους, έδειξαν ότι αρκούσε ένα ιός σχήματος ραβδίου για να πολλαπλασιαστεί μέσα στον πυρήνα δηλαδή κατά όμοιο τρόπο με αυτά των άλλων πυρηνικών πολυεδρώσεων.

Το πλέον χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι η γαλακτόχροη λεύκανση των προνυμφών σε αντίθεση με τη γκριζόχροη όψη των υγιών ατόμων. Το σώμα τους είναι διογκωμένο και το σωματικό περίβλημά τους μοιάζει έτοιμο να διαλυθεί με την ελάχιστη πίεση. Οι προνύμφες συνεχίζουν να τρέφονται και να μετακινούνται όλο και πιο αργά και λιγότερο συχνά, μέχρι τη νύμφωση. Κατά το νυμφικό στάδιο δημιουργούνται αλλοιώσεις τέτοιες που οδηγούν σε μία μεγάλη θνησιμότητα των εντόμων. (GUELPA, 1977).

Τα έγκλειστα μετά από κάθαρση έχουν διαστάσεις 4-7 μ m μήκος και σχήμα μισοφέγγαρου. Το βίριον έχει σχήμα ραβδίου, μεγέθους 230nmX110nm, αποτελείται από ένα χαλαρό κάλυμμα και από ένα κυλινδρικό και άκαμπτο καψίδιο, διαστάσεων 220nmX75nm. Περιέχει ένα μόριο διπλονηματικού κυκλικού DNA μοριακού βάρους 100 εκατομμυρίων daltons περίπου (RENET and GUELPA, 1972). Η πολυεδρίνη, δηλαδή η πρωτεΐνη του καλύμματος έχει μοριακό βάρος 25.000 daltons που είναι κατώτερο από εκείνο των πρωτεϊνών των εγκλεισμάτων άλλων Baculovirus σε άλλα είδη εντόμων που έχουν μελετηθεί (BERGOIN and GUELPA, 1977).

Πυρηνική πολυέδρωση του *Aedes sollicitans*

Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από την παράλυση του σώματος των προνυμφών και από τη λεύκανση του πεπτικού σωλήνα (CLARK et al. 1969). Το περιεχόμενο των γαστρικών θηλών και του μεσεντέρου παρατηρούμενο στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμφανίζει έγκλειστα σωματίδια περισσότερο ή λιγότερο σφαιρικά διαμέτρου από 0,1-1μm που περιέχουν τα βίριον σε ραβδία των 250nmX76nm.

Πυρηνική πολυέδρωση του *Aedes triseriatus*

Ο ιός αυτός μολύνει τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού ιστού της προνύμφης (FEDERIC and ANTONY, 1972), ενώ η δομή και η εξέλιξη της ασθένειας ομοιάζει με εκείνη των άλλων Baculovirus. Τα νουκλεοκαψίδια σχηματίζονται μέσα σε ένα ιογενές στρώμα και κατόπιν ωθούνται προς την περιφέρεια όπου εξελίσσονται πριν να εγκλεισθούν μέσα στα μικρά πρωτεϊνικά κρύσταλλα. Όμως, σε περιπτώσεις εξαιρετικά σπάνιες τα μικρά αυτά πρωτεϊνικά έγκλειστα συγκεντρώνονται σε ατρακτοειδή σώματα, γενικά απομονωμένα, με διαστάσεις 5 έως 7 μm πλάτους και 10 έως 15 μm μήκους.

Πυρηνική πολυέδρωση της *Wnoemya smithii*

Η μόλυνση εντοπίζεται στα κύτταρα του μεσεντέρου και στις γαστρικές θηλές του πεπτικού σωλήνα όπως στις περισσότερες μολύνσεις από Baculovirus στα δίπτερα. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικρών εγκλειστών (0,3 έως 0,4 μm) που περιέχουν ένα έως τρία ιολογικά σωματίδια (HALL and FISH 1974). Περιστασιακά, αυτά τα έγκλειστα μπορούν να συγχωνευτούν όπως στο *Aedes triseriatus*, χωρίς όμως να έχουν παρατηρηθεί σχήματα ατρακτοειδή.

Τα βίριον έχουν την κλασική δομή ενός καλυμμένου ραβδίου των 250nmX70nm. Η μορφολογία τους και το μέγεθος τους μοιάζουν τελείως με αυτά του *Aedes sollicitans*. Το κάλυμμα σε αυτούς τους δύο ιούς είναι διογκωμένο στη μία από τις δύο άκρες του και του δίνει μία όψη βολβώδη.

Πυρηνική πολυέδρωση του *Anopheles subpictus*

Οι DASGUPTA και RAY (1954) επεσήμαναν μία παθολογική κατάσταση στο *A. subpictus* χαρακτηριζόμενη από τη συγκέντρωση εγκλειστών θετικών κατά χρώση Feulgen μέσα στους πυρήνες των κυττάρων του μεσεντέρου. Καμιά όμως λεπτομερής μελέτη δεν έγινε για το παθογόνο αυτό αίτιο.

Πυρηνική πολυέδρωση του *Rhynchosciara angelae*

Ο ιός εξελίσσεται μέσα στους πυρήνες των κυττάρων των γαστρικών θηλών (caeca) και του μεσεντέρου και η ανάπτυξη του σχετίζεται με τα γιγαντιαία χρωματοσώματα που χαρακτηρίζουν αυτά τα κύτταρα (PAVAN και άλλοι 1971). Η μόλυνση δημιουργεί υπετροφία στα ευαίσθητα κύτταρα και μία σημαντική αύξηση του μεγέθους των χρωματοσωμάτων, πράγμα που επιτρέπει μία λεπτομερή ανάλυση των χρωμοσωμικών αλλαγών που παράγονται από τον ιό καθώς και τις σχέσεις μεταξύ ιολογικού πολλαπλασιασμού και γενετικού υλικού των κυττάρων Ξενιστών. (MORGANTE et al. 1974).

Πυρηνική πολυέδρωση του *Merodon equestris*

Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από την παρουσία ιών DNA που υπέστησαν κάθαρση προερχόμενοι από υπερβολικά διογκωμένους σιελογόνους αδένες στο *M. equestris*, (AMARGIER et al. 1979). Τα επιμηκυσμένα σωματίδια των 35nmX650nm είναι όμοια με τα γυμνά νουκλεοκαψίδια των Baculovirus στο στάδιο του σχηματισμού τους μέσα στον πυρήνα. Όμως, το σημαντικό πάχος της πλευράς που είναι μεταξύ νουκλεοκαψιδίου και καλύμματος, είναι ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ιού και επί πλέον το ειδικά μεγάλο μέγεθος του (65nmX650-400nm).

2.2. ENTOMOPOXVIRUS

Entomopoxvirus του *Camptochironomus tentans*

Σε μία παλιά εργασία ο WEISER (1949) περιγράφει μία ασθένεια στις προνύμφες του *Camptochironomus tentans* που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ωοειδών εγκλειστών 2 έως 15 μm

μήκους και 2 έως 10 μm πλάτους μέσα στο κυττόπλάσμα των λιπωδών κυττάρων. Επί πλέον αυτών των εγκλείστων, σημειώνεται ένας μεγάλος αριθμός σφαιρικών κυττοπλασμικών σωματιδίων διαμέτρου 0,3 έως 0,5 μm .

Ξαναπαίρνοντας αυτό το υλικό που ήταν κλεισμένο σε παραφίνη 26 χρόνια μετά και επανακλείοντάς το μέσα στο υλικό "Vestopal" για ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ο WEISER (1969) παρατήρησε τη δομή των βίριον και συμπέρανε ότι ταιριάζει με τις ομάδες των poxvirus. Το σχήμα του βίριον (BERGOIN 1973) είναι ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο με γωνίες και ακμές στρογγυλεμένες με διαστάσεις 200-250nmX270-300nmX130-180nm. Στο εσωτερικό του καλύμματος του βίριον που έχει πάχος 150 έως 200 Å, υπάρχει ένα κεντρικό σώμα με σχήμα αμφιροπαλοειδές που εμφανίζει μία ουσία πυκνή στα διερχόμενα ηλεκτρόνια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Entomopoxvirus του *Chironomus luridus*

Ο GOTZ και συνεργάτες (1969) περιέγραψαν στην προνύμφη του *Chironomus luridus* μία ασθένεια χαρακτηριστική όπου εμφανίζονται λευκές κηλίδες επάνω σε όλο το σώμα. Αυτές οι κηλίδες προέρχονται από την συγκέντρωση μέσα στο λιπώδη ιστό κυρίως εγκλείστων ωοειδούς ή πολυγωνικού τύπου που έχουν διαστάσεις 4 και 7 μm . Σε ιστολογικές τομές επανευρίσκονται αυτά τα έγκλειστα και σε άλλους ιστούς όπως στο υπόδερμα και τα αιμοκύτταρα.

Το σχήμα των εγκλεισμένων ή ελευθέρων βίριον είναι ένα ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο με στρογγυλεμένα τα άκρα του, με μέγεθος κατά μέσο όρο 320nmX230nmX100nm (GOTZ et al. 1969, HUGER et al. 1970). Μετά από διάλυση των εγκλεισμάτων σε διάλυμα ανθρακικού νατρίου 0,1M και χρώση με PTA (φωσφοροβολφραμικό οξύ) μπορούμε να παρατηρήσουμε τα βίριον έντονα αποδομημένα που παρουσιάζουν ένα παραλληλόγραμο νουκλεοειδές (nucleoid) από το οποίο μερικές φορές εξέρχεται ένα ραβδοειδές σωματίο.

Entomopoxvirus του *Chironomus attenuatus*

Οι STOLTZ και SUMMERS (1972) στις Η.Π.Α., παρατήρησαν στις προνύμφες του διπτέρου *Chironomus attenuatus* μια ασθένεια που ομοιάζει πολύ με αυτή που έχει περιγραφεί στην Ευρώπη στο *Chironomus luridus*. Φαίνεται όμως ότι μόνο τα αιμοκύτταρα μπορούν να προσβληθούν και αυτό, σε ένα στάδιο προχωρημένης

μόλυνσης όπου απαντώνται και έχουν 6μm διάμετρο. Τα βίριον που περιέχονται μέσα σε αυτά τα έγκλειστα έχουν μορφή κυβοειδή και διαστάσεις 250nmX250nmX110nm. Διαθέτουν ένα νουκλεοειδές σχήματος αμφιροπαλοειδούς. Ένας ιός τελείως όμοιος τόσο ως προς τη δομή όσο και προς τον εντοπισμό του στα αιμοκύτταρα έχει περιγραφεί από τον FEDERICI και συνεργ. (1974) στο *Goeldichironomus holoprasinus*.

2.3. IRIDOVIRUS

Ένας μεγάλος αριθμός από ιούς αυτής της ομάδας έχει σημειωθεί στα δίπτερα. Θα περιγραφούν δύο από αυτούς τους τύπους. 1) Ο *Tipula Iridescent Virus* - (TIV, τύπος 1 στο *Tipula paludosa*) και 2) Ο *Mosquito Iridescent Virus* - (MIV, τύπος 3 στο *Aedes taeniorhynchus*).

Iridovirus του *Tipula paludosa* (TIV - Τύπος 1)

Τα συμπτώματα της ασθένειας αυτής που περιγράφησαν το 1954 από τον XEROS είναι πολύ χαρακτηριστικά. Καθώς οι υγιείς προνύμφες είναι φαιόχρες και θαμπές, οι προσβεβλημένες παίρνουν διαφανές κυανό χρώμα (blue indigo - λουλακί). Κατά την ανατομία οι υπερτροφικοί λοβοί του λιπώδη ιστού φαίνονται σαν έδρα εκπομπής αυτής της ιριδιζουσας κυανής χρώσης. Τελικά ο λιπώδης ιστός φαίνεται ότι είναι η κυριότερη περιοχή πολλαπλασιασμού του ιού ο οποίος μολύνει και άλλα όργανα.

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε λεπτές τομές, τα προσβεβλημένα κύτταρα παρουσιάζουν ένα κυττόπλασμα γεμάτο από παρασφαιρικά ιολογικά τεμαχίδια που είναι τοποθετημένα σε παρακρυσταλλική διευσθέτηση. Οι μικροκρυσταλλικοί αυτοί σχηματισμοί στα ζωντανά έντομα είναι υπεύθυνοι, για τον ιριδισμό των προνυμφών, από όπου δόθηκε το όνομα της ιριδιζουσας ιώσεως, σε αυτή την ασθένεια.

Το υπεύθυνο αίτιο είναι ένας ιός εικοσαεδρικής συμμετρίας που σε υπερ-λεπτή τομή παρουσιάζει ένα περίβλημα εξαγωγικό και έχει διάμετρο 130nm (WILLIAMS και SMITH, 1958). Το βίριον αποτελείται από μία πυκνή κεντρική μάζα στα διερχόμενα ηλεκτρόνια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και περιέχει DNA καλυπτόμενο από ένα καψίδιο που σχηματίζεται από δύο μεμβράνες ενωτικού τύπου και στενά συγκολλημένες (STOLTZ, 1973). Στην εξωτερική όψη το καψίδιο φέρει υποενότητες με διάταξη ισόπλευρου τριγώνου (WRIGLEY 1968). Το ιολογικό γονιδίωμα αποτελείται από ένα μόριο γραμμικού διπλονηματικού DNA, υψηλού μοριακού βάρους. (BELLET και INMAN, 1967). Πρόκειται για ένα βίριον μεγάλου μεγέθους με κυττοπλασμική σύνδεση που δεν

παράγει έγκλειστα σωματία. Ο Iridovirus του *T. paludosa* έχει ένα πολύ εκτεταμένο φάσμα ξενιστών. Σύμφωνα με το SMITH et al., (1961) πολλά δίπτερα, λεπιδόπτερα και κολεόπτερα είναι ευαίσθητα σε μολύνσεις με ιούς αυτού του τύπου είτε με έγχυση είτε *per os*.

Iridovirus του *Aedes taeniorhynchus* (MIV - Τύπος 3)

Ο ιός αυτός όπως οι περισσότεροι iridovirus που απομονώθηκαν από τα κουνούπια, παράγει έναν πρασινωπό ιριδισμό στις μολυσμένες προνύμφες.

Σε παρατηρήσεις των προσβεβλημένων από τον MIV κυττάρων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, εμφανίζονται δύο χαρακτηριστικά: Το μεγάλο μέγεθος των ιολογικών τεμαχιδίων και το πολυεδρικό τους περίβλημα πολύ καθαρό, που προσδίδει μια συμμετρία εικοσαεδρική.

Η διάμετρος των ιολογικών σωματιδίων του MIV εκτιμάται στα 180nm (KELLY and ROBERTSON, 1973).

Η πιο προχωρημένη μορφολογική μελέτη έχει περιγραφεί από τον STOLTZ (1973) και είναι η ακόλουθη: Το κέντρο του ιολογικού σωματιδίου αποτελείται από μία μάζα πυκνή στα διερχόμενα ηλεκτρόνια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, φύσεως δεσοξυριβοζονουκλεοπρωτεϊνικής (DNA). Ο κεντρικός πυρήνας έχει ονομασθεί νουκλεοειδές (nucleoid). Περιβάλλεται από μονή μεμβράνη και το σύνολο (νουκλεοειδές+μεμβράνη) ονομάζεται "core" (κεντρικό τμήμα), κατ' αναλογία με τη δομή που υπάρχει στους ροχνίριους. Αυτή η "core" είναι εγκλεισμένη σε ένα καψίδιο πρωτεϊνικής φύσεως η οποία ορίζεται από τον εικοσαεδρικό σχηματισμό του ιολογικού τεμαχιδίου. Σε ένα ορισμένο αριθμό περιπτώσεων η εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου φέρει ινίδια τα οποία ομοιάζουν με τα ινίδια του adenovirus. Οι δομικές ιδιότητες οι οποίες διαφοροποιούν τους Iridovirus της *T. paludosa* και εκείνους που παράγουν πράσινο ιριδισμό τους κάνει να ταξινομούνται στην ομάδα των chloriridovirus.

Οι iridovirus των κουνουπιών είναι πολύ διαδεδομένοι στους φυσικούς πληθυσμούς αλλά η παθογόνος δύναμη του είναι ασθενής διότι ο κύκλος της εξέλιξής του είναι αργός και οι ιοί αυτοί εύκολα καταστρέφονται.

2.4. DENSOVIRUS

Αν και απαντώνται συχνά στα λεπιδόπτερα οι Densovirus είναι σχετικά λιγότερο εμφανιζόμενοι στα δίπτερα. Μερικές περιπτώσεις έχουν περιγραφεί στα Culicidae και μία περίπτωση στα Simuliidae.

Densovirus του *Aedes aegypti*

Πρόκειται για ένα ιό που απομονώθηκε από πληθυσμό εκτροφής του διπτέρου αυτού στο Εργαστήριο (LEBEDEVA 1973).

Η θέση πολλαπλασιασμού του ιού είναι ο πυρήνας και τα μολυσμένα κύτταρα παρουσιάζουν μία υπερτροφία του πυρήνα που είναι χαρακτηριστική.

Ο ιός εισέρχεται γρήγορα μέσα στον οργανισμό και μολύνει κυρίως τον λιπώδη ιστό, το υπόδερμα και τους μαλπιγγιανούς σωλήνες. Έχουν παρατηρηθεί παρακρυσταλλικοί σχηματισμοί του ιού μέσα στο κυττόπλασμα (BUCHATSKY et al. 1979). Ο υπεύθυνος παράγων είναι ένας μικρός ιός 20nm διάμετρο, με εικοσαεδρική δομή. Το γονιδίωμα συνίσταται από μονονηματικό DNA μικρού μοριακού βάρους.

Densovirus του *Simulium vitatum*

Ο ιός αυτός που ανακαλύφθηκε στους φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου, στην Καλιφόρνια, παράγει μία υπερτροφία των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντέρου στα οποία και πολλαπλασιάζεται (FEDERICI and LACEY, 1987). Αν και μικρότερης δραστηριότητας, ο ιός απαντάται ομοίως μέσα στα λιπώδη κύτταρα. Εξετάζοντας υπρλεπτές τομές στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρεί κανείς χονδρά ενδοπυρηνικά έγκλειστα που αντιστοιχούν στη συγκέντρωση μικρών ισομετρικών βίριον διαστάσεων περίπου 18nm διαμέτρου.

2.5. REOVIRUS

Δύο τύποι Reovirus είναι γνωστοί στα δίπτερα: εκείνοι που σχηματίζουν κυττοπλασμικά έγκλειστα σωματίδια και οι οποίοι κατατάσσονται στους Cyrovirus (MATTHEWS 1985) και εκείνοι χωρίς

έγκλειστα σωματίδια, που είναι πιο κοντά στους Reovirus των σπονδυλωτών.

Reovirus με έγκλειστα σωματία

Γνωρίζουμε αρκετές περιπτώσεις ιώσεων με έγκλειστα κυττοπλασμικά σωματία στα δίπτερα. Η πρώτη περίπτωση περιγράφηκε από τον KELLEN και συνεργάτες (1966) στις προνύμφες του *Culex tarsalis*. Αν και οι κλασσικοί Cyprovirus πολλαπλασιάζονται στα κύτταρα του μεσεντέρου, τα πολύεδρα αυτά έχουν βρεθεί στα υποδερμικά κύτταρα και στα κύτταρα των ιστογενετικών καταβολών του ακμαίου που υπάρχουν στις προνύμφες.

Ο δεύτερος Reovirus με έγκλειστα σωματία παρατηρήθηκε από τον STOLTZ και συνεργάτες (1969) στις προνύμφες του *Chironomus plumosus*. Προκαλεί ένα βαθύ φαιό χαρακτηριστικό χρώμα στο έντερο, που στο τέλος γίνεται υπόλευκο. Τα επιθηλιακά κύτταρα γεμίζουν από μικρά πολύεδρα, τα οποία μοιάζουν να είναι τα αποτελέσματα της συνένωσης των βίριον που περιτυλίσσονται ατομικά μέσα στην πρωτεΐνη του εγκλεισματος

Τέλος τέσσερις άλλοι ιοί αυτού του τύπου έχουν επισημανθεί στις προνύμφες των Simuliidae: Στο *Gnaphalia mutata*, *Prosimulium mixtum*, *Simulium argiraetum* και στο *Simulium natatum* (BAILEY et al. 1975, WEISER 1978, FEDERICI et al. 1973). Σε όλες τις περιπτώσεις πρόκειται για μολύνσεις που εντοπίζονται σε επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου.

Μη έγκλειστοι Reovirus

Πρόκειται κυρίως για ιούς που απομονώθηκαν από φυσικούς πληθυσμούς ή εκτροφών εργαστηρίου του *Drosophila melanogaster* (Virus F) και του *Ceratitis capitata* (Virus I) (PLUS et al. 1981). Αντίθετα με τους Reovirus με έγκλειστα σωματία οι οποίοι μολύνουν τις προνύμφες, οι μη έγκλειστοι Reovirus έχουν απομονωθεί αποκλειστικά από ακμαία ή κυτταρικές καλλιέργειες. Αυτοί οι ιοί πολλαπλασιάζονται μέσα στο έντερο των διπτέρων χωρίς εμφανές παθογόνο αποτέλεσμα. Χαρακτηρίζονται από ένα μέγεθος περίπου 60nm και από ένα διπλό καψίδιο. Το γονιδίωμα τους αποτελείται από 10 τμήματα (segments) διπλονηματικού RNA. Ιοί που μοιάζουν πολύ με τους παραπάνω έχουν απομονωθεί από το *Musca domestica* (MOUSSA 1980) και πιο πρόσφατα από το *D. oleae* (MANOUSIS et al. 1987).

Αυτοί οι ιοί συγγενεύουν με τον ιό ο οποίος ανακαλήφθηκε στον *D. oleae* (ANAGNOU M, 1980, BERGOIN και συνεργ. 1983, ANAGNOU και συνεργ. 1984) σε φυσικούς πληθυσμούς από διάφορες περιοχές της Ελλάδος.

2.6. PICORNAVIRUS

Picornavirus της δροσόφιλας

Πολλοί μικροί ιοί που παρουσιάζουν όλα τα χαρακτηριστικά των Picornavirus των σπονδυλωτών έχουν απομονωθεί από φυσικούς ή εργαστηριακούς πληθυσμούς της δροσόφιλας καθώς και σε κυτταροκαλλιέργειες in vitro αυτού του εντόμου (JOUSSET et al. 1972, BRUN and PLUS 1980). Αυτοί οι ιοί οι οποίοι πολλαπλασιάζονται σε διάφορους ιστούς του ακμαίου εντόμου σχηματίζουν συχνά συσσωματώματα από χαρακτηριστικούς ιούς. Στους Picornavirus της δροσόφιλας ο πιο χαρακτηριστικός είναι ο ιός DVC (*Drosophila C. Virus*). Τα βίριον έχουν διαστάσεις 30nm διάμετρο και το καψιδιό τους αποτελείται από πρωτεΐνες μοριακού βάρους 31 kd*, 30 Kd, 28 Kd και 8,5 Kd. Το γονιδίωμα τους είναι ένα RNA απλής αλύσου περίπου 30 Kd (JOUSSET et al. 1977).

Αυτοί οι ιοί έχουν απομονωθεί από έντομα που προέρχονται από διάφορες περιοχές αλλά η αποτελεσματικότητά τους στους φυσικούς πληθυσμούς της δροσόφιλας φαίνεται πολύ περιορισμένη (PLUS et al. 1972). Για μερικούς από αυτούς τους ιούς έχει επισημανθεί η διάδοσή τους δια μέσου των ωαρίων (JOUSSET et PLUS 1975).

Ενας ιός πολύ συγγενής του DCV είναι ο ιός Kawino που έχει απομονωθεί από τα κουνούπια *Mansonia uniformis* (PUDNEY et al. 1978).

2.7. ΑΛΛΟΙ ΜΙΚΡΟΙ ΙΟΙ ΜΕ RNA

Μεγάλος αριθμός μικρών ιών μεγέθους παρόμοιου ή ολίγον μεγαλύτερου από αυτόν του Picornavirus έχει σημειωθεί στα δίπτερα. Αναφέρονται ο ιός RS της Δροσόφιλας, δύο ιοί που απομονώθηκαν ο ένας από το *Dacus tryoni*, ο άλλος από το *Dacus*

* Kd: Kilodaltons

oleae και ο ιός Nodamura τον οποίο ο συγγραφέας (SCHERER et al. 1967), προσδιόρισε από τις τομές των εγκλεισμάτων που προορίζονταν για μικροσκοπική εξέταση και έδωσε το όνομα σε αυτόν - "Cytoplasmic Inclusion Virus" (CIV). Όμως, αυτά τα συσσωματώματα του ιολογικού υλικού δεν έχουν τίποτα το συγκρίσιμο με τα πολύεδρα του Cyronivirus. Αυτοί οι ιοί αρχικά μοιάζουν πολύ με εκείνους που έχουν ανακαλυφθεί στο *D. oleae* (BERGOIN και συνεργ. 1983).

Ιός του *D. oleae*

Σε μία πρόσφατη δημοσίευση οι MANOUSIS και συνεργ. (1986) σημειώνουν την παρουσία, σε ακμαία άτομα του δάκου της ελιάς που προερχόνταν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, ενός μικρού ιού των 35nm διαμέτρου συγκριτικά όμοιου με εκείνον που έχει περιγραφεί ενωρίτερα. (BERGOIN και συνεργ. 1981).

Ιός RS της Δροσόφιλας

Ο ιός RS της *D. melanogaster* ανακαλύφθηκε σε ένα φυσικό πληθυσμό που προερχόνταν από την Σιγκαπούρη (PLUS et al. 1975).

Το βίριον έχει ένα σχήμα ωοειδές που θυμίζει λεμόνι. Το μέγεθος είναι 52nm μήκος και 32nm πλάτος. Το σχήμα αυτού του ιού είναι πολύ συγγενές του ιού της "Χρόνιας Παράλυσης της Μέλισσας" (CBPV) (BAILEY et al. 1965).

Ιός CIV του *Dacus tryoni*

Ο MOUSSA (1978) περιέγραψε στο *D. tryoni* έναν μικρό ισομετρικό ιό, διαμέτρου 40-65nm που είχε την ιδιότητα να περιβάλλεται από ένα κάλυμμα με μία εξάγωνική περίμετρο. Αυτός ο ιός που έχει κυττοπλασμική θέση αναπαραγωγής, μολύνει τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου των ακμαίων εντέρων. Τα ιολογικά σωματίδια σχηματίζονται μέσα σε ιογενή στρώματα που μετατρέπονται σε σωρούς βίριον.

Ιός Nodamura

Πρόκειται για έναν ιό που απομονώθηκε αρχικά από το *Culex tritaenirynchus* στην Ιαπωνία (SCHERER et al., 1967). Αυτός ο ιός συμμετρίας εικοσαεδρικής έχει μία διάμετρο 30 nm περίπου. Έχει ένα έντονο χαρακτηριστικό ότι το γονιδίωμα του αποτελείται από 2 μόρια RNA απλής αλύσου, μοριακού βάρους 0,5 και 1X10kd και ότι το καψίδιο έχει ένα πολυπεπτίδιο των 40kd (NEWMAN και BROWN, 1973). Οι ιδιότητες αυτές επέτρεψαν τον προσδιορισμό μιας νέας οικογένειας ιών τους Nodaviridae (MATTHEWS, 1983) στην οποία συνδέθηκαν πολλοί άλλοι ιοί εντόμων

2.8. BIRNAVIRUS

Οι δύο ιοί των διπτέρων που ανήκουν σε αυτή την ομάδα κυρίως παρουσιάζονται στα σπονδυλωτά. Πρόκειται για τον ιό X της δροσόφιλας και ένα ιό που απομονώθηκε από ένα φυσικό πληθυσμό των *Culicoides*.

Ιός X της δροσόφιλας

Αυτός ο ιός ανακαλύφθηκε μέσα στις καλλιέργειες των κυττάρων in vitro της δροσόφιλας (TENINGES et al., 1979). Το βίριον έχει ένα καψίδιο τυπικής εικοσαεδρικής συμμετρίας με εξαγωνική περίμετρο. Έχει διαστάσεις 58nm διάμετρο και το γονιδίωμα του αποτελείται από 2 μόρια διπλονηματικού RNA με 2,2 και 2,6x10 εκατομ. daltons. Τέσσερα πολυπεπτίδια των 100kd, 45kd, 35kd, και 25kd, λαμβάνουν μέρος στη δομή του βίριον. Αυτός ο παθογόνος ιός της δροσόφιλας θεωρείται σαν ένα μόλυσμα του εμβρυακού βοείου ορού (Fetal bovine serum) που χρησιμοποιείται για την παρασκευή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας κυττάρων in vitro.

Birnavirus των *Culicoides*

Αυτός ο ιός ανακαλύφθηκε σε ένα φυσικό πληθυσμό του *Culicoides* sp. που συλλέχθηκε στην περιοχή της Αλσατίας. Μολύνει τα περιτραχειακά και επιδερμικά κύτταρα στα οποία σχηματίζονται παρακρυσταλλικά συσσωματώματα (MIALHE, 1982). Το βίριον είναι τελείως όμοιο με εκείνο του ιού X της Δροσόφιλας αν και η διάμετρός του των 54nm είναι ελαφρά μικρότερη.

Περιέχει 2 μόρια διπλονηματικού RNA, μοριακού βάρους πολύ συγγενούς του ιού X της δροσόφιλας, $12,5 \times 10^{-6}$ και 26×10^{-6} daltons. Το καψίδιο μεγέθους μεταξύ 105Kd και 25Kd αποτελείται από 6 πολυπεπίδια (MIALHE et al. 1983).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- AMARGIER, A., LYON, J.P., VAGO, C., MEYNADIER, G., and VEYRUNES, J.C., 1979.- Mise en évidence et purification d' un virus dans la prolifération monstrueuse glandulaire d' insectes. Etude sur *Merodon equestris*, F. (Diptere, Syrphidae) C. R. Acad. Sci., D., 1979, 289: 481-484.
- ANAGNOU-VERONIKI, M., 1980.- Rapport final de stage. UNDP/PROJET GRE/69/525, Stage D.P. 9/14 Dossier FAO No 4871: 1-25, 1-6.
- ANAGNOU-VERONIKI, M., 1981.- Compte-rendu de stage. INRA-CNRS, 30380-Saint-Christol: 1-4.
- ANAGNOU-VERONIKI, M., 1983.- Compte-rendu du stage. INRA-CNRS, 30380-Saint-Christol: 1-5.
- ANAGNOU-VERONIKI, M., 1984.- Compte-rendu du stage. INRA-CNRS, 30380-Saint-Christol: 1-5.
- ANAGNOU-VERONIKI, M., BERGOIN, M. and VEYRUNES, J.C., 1984.- Research on the Viral Infection of *Dacus Oleae* (Gmel). In "Agriculture" C.E.C. Programme on Intergrated and Biological Control CAVALLORO R., PIAVAUX EUR. 8689.:201-207
- ANONYMOUS, 1990.- State and Trend of the Table Olive Market. State Trend of the Olive Oil Market. *Olivae*, No 30: 16-19.
- ARAMBOURG, Y., 1986.- Entomologie Oleicole. Edit. Y. ARAMBOURG, Conseil Oleicole International, Madrid, 1-360.
- BAILEY, L., 1965.- Paralysis of the Honey Bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *J. Invertebr. Pathol.*, 7: 132-140.
- BAILEY, C.H., SHAPIRO, M., and GRANADOS, R.R., 1975.- A cytoplasmic and polyhedrosis virus from larval black - flies *Gnephia mutata* and *Prosimulium mixtum* (Diptera, Simuliidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 25: 273-274.
- BELLET, A.J.D., and INMAN, R.B., 1967.- Some properties of deoxyribonucleic acid preparations from *Chilo*, *Sericesthis* and *Tipula* iridescent viruses. *J. Mol. Biol.*, 25: 425-432.
- BERGOIN, M., 1973.- Contribution a l' etude des entomopoxvirus. *These Doct. Sci. nat.*, Univ. Aix - Marseille II. Avril. 1973, 214pp, 59pl.

- BERGOIN, M., ANAGNOU-VERONIKI, M., VEYRUNES, J.C., and CROIZIER, G., 1983.- Two viruses recently isolated from the Olive fly *Dacus oleae* Gmelin (Trypetidae). In "Proceedings of the 16e Annual meeting of S.I.P." Cornell University, Ithaca (N.Y), 7-11 August 1983: 56-57.
- BERGOIN, M. and GUELPA, B., 1977.- Dissolution des inclusions du virus de la polyedrose nucleaire du Diptere *Tipula paludosa* MEIG. Etude ultrastructurale du virion. *Arch. Virol.*, 1977, 53: 242-254.
- BOLLE, J., 1873.- Jahrbuch der k.k. Seidenbau - Versuchsstation in Gorz. Verlag der k.k. Seidenbau - Versuchsstation in Gorz, 1874: 129.
- BOLLE, J., 1893,- Jahrbuch der k.k. Seidenbau - Versuchsstation in Gorz. Verlag der k.k. Seidenbau - Versuchsstation in Gorz, 1894: 112.
- BONAMI, J.R., 1976.- Les maladies virales des crustaces et des mollusques. *Oceanis*, 3: 154-175.
- BRENNER, S. and HORNE, R.W., 1959.- A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. biophys. Acta*, 34: 103-110.
- BROUMAS, T., and HANIOTAKIS, G., 1987.- Further studies on the control of the Olive Fruit fly by mass trapping. In "Proc. of the 2nd Intern. Symposium" Crete, Greece, 1986: 561-565.
- BROUMAS, T., HANIOTAKIS, G., LIAROPOULOS, C., and YAMVRIAS, C., 1986.- Experiments on the control of the olive fruit fly by mass trapping. *Proc. International Joint Meeting on integrated pest control in olive groves*, Pisa, Italy 3-6 Apr. 1984. (eds R. CAVALLORO, A. CROVETTI): 411-419.
- BROUMAS, T., HANIOTAKIS, G., YAMVRIAS, C. and STAVRAKIS, G., 1990.- Comparative study of a mass trapping method and various bait sprays for the control of the olive fruit fly.- First year results. In "Pesticides and Alternatives" ed J.E., CASSIDA, 1990, Elsevier Science Publishers B.V. 205-215.
- BRUN, G. and PLUS, N., 1980.- The viruses of *Drosophila*. In "The genetics and biology of *Drosophila*" 2d, (M. Ashburner T.R.F. Wright, eds.), 1980, London, Academic Press p.625-702.
- BUCHATSKY, L.P., and RAIKOVA, A.P., 1979.- Electron microscope study of mosquito densovirus maturation. *Ac. virol.* 23:170-172.

- BUJARD, E., 1950.- Abrege de Technique Microscopique pour travaux usuels d' Histologie. Librairie PAYOT, Lausanne: 1-119.
- BURGES, H.D., 1981.- "*Microbial Control of Pests and Plant Diseases*". 1970-1980. Academic Press, London 1-949.
- CLARK, T.B., CHAPMAN, H.C. and FUCUDA, T., 1969.- Nuclear - polyhedrosis and cytoplasmic - polyhedrosis virus infections in Louisiana mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.*, 14: 284-286.
- DASGUPTA, B., and RAY, H.N., 1954.- Occurrence of intranuclear inclusion bodies in the larva of *Anopheles subpictus*. *Bull. Calcutta School trop. Med.*, 2: 57-58.
- DELANOUE, P., and ARAMBOURG, Y., 1965.- Contribution a l' etude au laboratoire d' *Eupelmus urozonus* DALM. (Hym. Chalcidoidea, Eupelmidae). *Ann. Soc. ent. Fr.* NS. 1:817-842.
- DELANOUE, P., and ARAMBOURG, Y., 1967.- Contribution a l' etude en laboratoire de *Pnigalio mediterraneus*. (Hym. Chalcidoidea, Eulophidae). *Ann. Soc. ent. Fr.*, N.S., 3:909-927.
- DELANOUE, P., and ARAMBOURG, Y., 1969.- Contribution a l' etude au laboratoire d' *Eurytoma martelii* (Hym. Chalcidoidea, Eurytomidae). *Ann. Soc. ent. Fr.* N.S., 5: 811-824.
- DELUCCHI, V., 1957.- Les parasites de la Mouche de Olives. *Entomophaga*, 2: 107-118.
- DERBYSHIRE, J.B., and WOODE, G.N., 1978.- Classification of Rotavirus. Report from World Health Organisation/Food and Agriculture Organisation Comparative Virology Program. *J. Amer. Ver. Med. Ass.*, 173: 519-521.
- DEVAUCHELLE, G., and VAGO, C., 1971.- Particules d' allure virale dans les cellules de l' estomac de la seiche *Sepia officinalis*. L. (Mollusque, Cephalopodes). *C. R. Acad. Sci., D.*, 272: 894-896.
- DISCHE, Z., 1930.- Uber einige neue charakteristische farbreaktronen der Thymonukleinsaeure und eine mikromethods zur bestimmung derselben in tierischen organen mit Hilfe dieser reaktionen. *Microchemie*, 8: 4-32.
- DREW, R.A.I., 1989.- The tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the Australasian and Oceanian regions. *Memoirs of the Queensland Museum*, 26: 1-521.

- ECONOMOPOULOS, A.P., and TZANAKAKIS, M.E., 1967.- Egg yolk and olive juice as supplements to the yeast hydrolysate-sucrose diet for adults of *Dacus oleae*. *Life Sci.* 6: 2409-2416.
- FEDERICI, B.A., 1973.- Preliminary studies on a cytoplasmic polyhedrosis virus of *Aedes taeniorhynchus*. *5th Internation. Colloq. Insect Pathol. Microb. Control*, 1: 34.
- FEDERICI, B.A., 1974.- Virus pathogens of mosquitoes and their potential use in mosquito control. In "*Mosquito control*" p.93-135. Semin. Intern. Demoustic., Trois-Rivieres, Quebec, Canada 8-10 mai 1973 Presses Univ. Quebec, 1974.
- FEDERICI, B.A., and ANTHONY, D.W., 1972.- Formation of virion-occluding proteinic spindles in a baculovirus disease of *Aedes triseriatus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 20:129-138.
- FEDERICI, B., and LACEY, L., 1987.- Intranuclear disease of uncertain etiology in larvae of the Black-fly, *Simulium vittatum*. *J. Invertebr. Pathol.* 50: 184-190.
- FERRIERE, C., and DELUCCHI, V., 1957.-Les Hymenopteres parasites de la Mouche des olives. I.-Les Chalcidiens de la region mediterraneenne. *Entomophaga* 2:119-124.
- FUKAYA, N. and NASU, S., 1966.- A *Chilo* iridescent virus (CIV) from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera, Pyralidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 1, 69-72.
- FYTIZAS, E., and TZANAKAKIS, M.E., 1966.- Developpement des larves de *Dacus oleae* dans des olives lorsque leurs parents ont recu la streptomycine, incorporee a leur nourriture. *Ann. Epiphyties* 17: 53-59.
- GILES, K.W., and MYERS, A., 1965.- An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*, London, 206: 93.
- GOTZ, P., HUGER, A.M., and KRIEG, A., 1969.- Uber ein Insektenpathogenes Virus aus der Gruppe der Pockenviren. *Naturwissenschaften*, 56: 145-146.
- GOURDON DE NAGES, 1852.- L' art d' elever les Vers a Soie. Nimes, p. 62, 1852.
- GUELPA, B., 1977.- Recherches sur le Baculovirus du Diptere *Tipula paludosa* MEIGEN. These Doct. Spec. Univ. Sci. Techn., Languedoc, Montpellier, 7 mai 1977, 102 p.

- HAGEN, K.S., 1966.- Dependence of the olive fly, *Dacus oleae* larvae on symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive. *Nature*, London, 209: 423-424.
- HAGEN, K.S., SANTAS, L., and TSECOURAS, A., 1963.- A technique of culturing the olive fly *Dacus oleae* Gmel. on synthetic media under xenic conditions. In "Radiation and Radioisotopes Applied to Insects of Agricultural Importance". *Int. Atom. Energy Agency*, Vienna, 333-356.
- HALL, D.W., and FISH, D.D., 1974.- A baculovirus from the mosquito *Wyeomyia smithii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 23: 383-388.
- HANIOTAKIS, G.E., and AVTZIS, N., 1977.- Mortality in *Dacus oleae* (Gmelin) through infection with *Pseudomonas putida*. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 9 (2): 299-311.
- HANIOTAKIS, G.E., KOZYRAKIS, E., and BONATSOS, C., 1986.- Control of the olive fruit fly *Dacus oleae* Gmel. (Dipt., Tephritidae) by mass trapping: Pilot scale feasibility study. *J. Appl. Entomol.* 101:343-352.
- HANIOTAKIS, G.E., KOZYRAKIS, M., and BONATSOS, K., 1987.- Area-wide management of the Olive Fruit fly by feeding attractants and Sex Pheromones on toxic traps. *Proc. of the 2nd Intern. Symposium In "Fruit flies"* 16-21 Sept. 1986, Crete, Greece, 549-560.
- HANIOTAKIS, G.E., VASSILIOU-WAITE, A.-1987 Effect of combining food and sex attractants on the capture of *Dacus oleae* flies. *Entomologia Hellenica* 5: 27-33.
- HARTREE, E.F., 1972.- Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48: 422-427.
- HUGER, A.M., KRIEG, A., EMSCHERMANN, P., and GOTZ, P., 1970.- Further studies on *Polyoxvirus chironomi*, an insect virus of the pox group isolated from the midge *Chironomus luridus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 253-261.
- HULL, R., 1985.- Purification, Biophysical and Biochemical Characterisation of Viruses with Especial Reference to Plant Viruses. In "*Virology a practical approach*" Ed: B.W.J. MAHY, IRL Press, Oxford Washington: 1-40.
- HUMASON, G., 1967.- Solution Preparation and General Laboratory Aids. In "*Animal Tissue Techniques*". Ed. Freeman and Company San Fransisco and London : 489-516.

- HURPIN, B., VAGO, C., ROBERT, P. and MEYNADIER, G., 1963.- La lethargie, nouvelle virose des larves de *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera Scarabaeidae). *Entomophaga*, 12: 311-317.
- INTERNATIONAL COMMITTEE FOR TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV), 1979.- Taxonomy of viruses explanatory text. A series of posters. Publ. PUDOC.- Centre for Agricultural Publishing and Documentation-Wageningen.
- ISAAKIDES, C.A., 1957.- Sur la lutte biologique contre le *Dacus oleae* ROSSI. *Entomophaga*, 2, 245-249.
- JOHNSON, P.T., 1977.- A viral disease of the blue crab. *Callinectes sapidus*: Histopathology and differential diagnosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 29: 201-209.
- JOKLIK, W.K., 1974.- Reproduction of Reoviridae. In "Comprehensive virology" vol 2: 231-334.
- JOUSSET, F.X., BERGOIN, M., and REVET, B., 1977.- Characterisation of the *Drosophila* C virus. *J. Gen. Virol.*, 34: 269-285.
- JOUSSET, F.X., and PLUS, N., 1975.- Etude de la transmission horizontale et de la transmission verticale des picornavirus de *Drosophila melanogaster* et de la *Drosophila immigrans*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 126B: 231-249.
- JOUSSET, F.X., PLUS, N., CROIZIER, G., and THOMAS, M., 1972.- Existence chez *Drosophila* de deux groupes de Picornavirus de propriétés serologiques et biologiques différentes. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1972 D, 275: 3043-3046.
- KELLEN, W.R., CLARK, T.B., LINDEGREN, J.E., and SANDERS, R.D., 1966.- A cytoplasmic - polyhedrosis virus of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.* 8:390-394.
- KELLY, D.C., and ROBERTSON, J.S., 1973.- Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. Gen. Virol.*, 20:17-44.
- KRIEG, A., and HUGER, A., 1960.- A virus disease of Coleopterous insect. *J. Insect Pathol.*:2, 274-288.
- KURSTAK, E., 1982.- Microbial and Viral Pesticides. MARCEL DEKKER, INC, New York: 1-720.
- LAEMMLI, U.K., 1970.- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, London: 227.

- LAMBROU, P.D. and TZANAKAKIS, M.E., 1978.- Inhibition of Larval Growth of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae) by Streptomycin II. Effect of treating the parents. *Ent. exp. and appl.* 23: 163-170.
- LANGERON, M., 1949.- Colorations par les couleurs d'aniline. In "*Precis de Microscopie*". Eds: Masson et Cie, Paris: 578-632.
- LEBEDEVA, O.P., KUZNETZOVA, M.A., ZELENKO, A.P., GUDZ-GORBAN, A.P., 1973.- Investigation of a virus disease of the denonucleosis type in a laboratory culture of *Aedes aegypti*. *Acta virol.*, 17:253-256.
- L' HERITIER, P., 1948.- Sensitivity to CO₂ in *Drosophila*. *Heredity*, 2: 325-348.
- L' HERITIER, P., 1952.- A convenient device for injecting large numbers of flies. *Serv. Drosophila Inf.*, 26:131.
- LIAROPOULOS, C., LOUSKAS, C., CANARD, M., et LAUDEHO, Y., 1977.- Lachers d'*Opius concolor* SZEPL (Hym. Braconidae) dans des populations de printemps de *Dacus oleae* GMEL (Dipt. Trypetidae). I. Experimentation en Grece continentale. *Entomophaga*, 22, 3,:259-264.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J., 1951.- Protein measurement Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- LUTHY, P., STUDER, D., JAQUET, F. and YAMVRIAS, C., 1983.- Morphology and in vitro cultivation of the bacterial symbiote of *Dacus oleae*. *Bull. Societe Ent. Suisse.* 56: 67-72.
- LUTHY, P., YAMVRIAS, C.N., STUDER, D., JAQUET, F., and ANAGNOU, M., 1983.- The symbiotic bacterium of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). 1st Hellenic Congress on Plant Diseases and Pests. Athens, 5-7 October 1983.
- MANOUSIS, T., ELEY, S.M., PULLIN, J.S.K., LAMBROPOULOS, A., and MOORE, N.F., 1986.- Preliminary search for a Virus in *Dacus oleae* Gmel. populations in Northern Greece. *Entomologia Hellenica*, 4: 15-18.
- MANOUSIS, T., KOLIAIS, S.I., and MOORE, N.F., 1987.- An inapparent infection with a probable picornavirus in several stocks of laboratory reared and naturally occurring populations of *Dacus oleae* Gmel. pupae in Greece. *Microbios*, 51: 81-88.

- MANOUSIS, T., and MOORE, N., 1987.- Searching for viruses pathogenic for the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmelin. In: *Fruit flies of Economic Importance* Rome, Italy, 7-10 April 1987.
- MARTIGNONI, M.E. and IWAI, P.J.; 1986.- A catalog. of viral diseases of Insects mites and ticks. 4th ed. rev. *Gen. Techn. Rep. PNW-195-Portland. OR: U.S. Depart. Agric., Forest Serv. Pacific Northwest Rec. Stat., 51p.*
- MATTHEWS, R.E.F., 1982.- Classification and Nomenclature of viruses. (Fourth report of the I.C.T.V.). Karger, Basel, *Intervirolgy*, 17: 1-199.
- MATTHEWS, R.E.F., 1985.- Viral taxonomy for the nonvirologist. *Ann. Rev. Microbiol. 1985*, 39: 451-474.
- McDONALD, D., 1991.- Biopesticides-pesticides with a bright future? *International Pest Control*, March/April 1991: 33-36.
- MEJBAUM, W.Z., 1939.- Uber die bestimmung kleiner pentosemengen, insbesondere in derivaten der adenylsaure. *Z. Physiol. Chem.*, 258: 117-120.
- MIALHE, E., CROIZIER, G., VEYRUNES, J.C., QUIOT, J.M., and RIEB, J.P., 1982.- Study of a Birnavirus isolated from a natural population of larvae of *Culicoides* sp.- Proc. 5th. Internation. Symp. Ceratopogonidae, Strasbourg, July 1982, *Mosquito News*, 42: 527-528.
- MIALHE, E., CROIZIER, G., VEYRUNES, J.C., QUIOT, J.M., and RIEB, J.P., 1983.- Etude d' un virus isole d' une population naturelle de *Culicoides* sp. (Diptera Ceratopogonidae). *Ann. Virol.*, (Inst. Pasteur), 134E: 73-86.
- MOKHTAR-MAAMOURI, F., ABBERT, A., MAILLARD, C. and VAGO, C., 1976.- Infection virale chez un platelminthe parasite - *C. R. Acad. Sci., D.* 283: 1249-1251.
- MONASTERO, S., 1968.- Nota sui lanci di *Opius concolor* SZEPL. fatti nell' isola di Chalki (Grecia) nel 1965. *1st. Ent. agric. Univ. Palermo* 60: 143-146.
- MOREL, G., 1975.- Un virus cytoplasmique chez le scorpion *Buthus occitanus* (Amoureux) -*C.R. Acad. Sci., D.*, 280: 2893-2894.

- MORGANTE, J.C., DA CUNHA, A.B., PAVAN, C., BIESELE, J.J., RIESS, R.W., and GARRIDO, M.C., 1974.- Development of a nuclear polyhedrosis in cells of *Rhynchosciara angelae* (Diptera Sciaridae) and patterns of DNA synthesis in the infected cells. *J. Invertebr. Pathol.* 24: 93-105.
- MOUSSA, A.Y., 1978.- A new Virus Disease in the Housefly, *Musca domestica* (Diptera).-*J. Invertebr. Pathol.*, 31: 204-216.
- MOUSSA, A.Y., 1978.- A new Cytoplasmic Inclusion Virus from Diptera in the Queensland Fruit fly, *Dacus tryoni* (Frogg) (Diptera: Tephritidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 32: 77-87.
- MOUSSA, A.Y., 1980.- The Housefly Virus Contains Double - Stranded RNA. *Virology*, 106: 173-176.
- NEWMAN, J.F.E., and BROWN, F., 1973.- Evidence for a divided genome in Nodamura virus, an arthropod-borne picornavirus. *J. Gen. Virol.*, 21: 371-384.
- ORMIERES, R., PRALAVORIO, R., YAMVRIAS, C., and LAUDEHO, Y., 1977.- *Octosporea muscaedomesticae*. Flu (Microsporidia) parasite de *Ceratitis capitata* Wied. et de *Dacus oleae* Gmel. (Dipt. Trypetidae). *Biol. Gallo-Hellen.*, 6, No 2, :259-270.
- PASTEUR, L., 1870.- Etude sur la maladie des Vers a soie moyen pratique assure de la combattre et d' en prévoir le retour - Gauthier - Villars, Paris: 179.
- PAVAN, C., DA CUNHA, A.B., and MORSOLETTI, C., 1971.- Virus - chromosome relationships in cells of *Rhynchosciara* (Diptera, Sciaridae). -*Caryologia*, 24 (3), 371-389.
- PAYNE, C.C., and RIVERS, C.F., 1976.- A provisionnal classification of CPV based on the sizes of the RNA genome segments. *J. Gen. Virol.*, 33: 71-85.
- ΠΕΛΕΚΑΣΗΣ, Κ.Ε.Δ., 1962.- Κατάλογος των σπουδαιότερων εντόμων και άλλων ζώων σημειωθέντων ως επιβλαβών εις την Ελληνικήν Γεωργίαν κατά την τελευταίαν τριακονταετίαν. *Χρον. Μπενακείου Φυτοπαθ. Ινστ.* (Ν.Σ)5: 5-104.
- PETRI, L., 1909.- Ricerche sopra i batteri intestinali della Mosca olearia.-*Memorie della Stazione Pathologia Vegetale*, Roma : 1-130.
- PETRI, L., 1910.- Untersuchungen uber die Darmabakterien der Olivenfliege. *Zentralbl. Bacteriol. Parastenkd. infekionsk. Hyg.* 2 Abteilung, 26: 357-367.

- PLUS, N., CROIZIER, G., DUTHOIT, J.L., DAVID, J., ANXOLABEHRE, D., and PERIQUET, G., 1975.- Decouverte chez la *Drosophile* de virus appartenant a trois nouveaux groupes. *C.R. Acad. Sci., D.*, 280:1501-1504.
- PLUS, N., GISSMAN, L., VEYRUNES, J.C., PFISTER, H., and GATEFF, E., 1981.- Reovirus of *Drosophila* and *Ceratitis* populations and of *Drosophila* cell lines: a possible new genus of the *Reoviridae* family. -*Ann. Virol (Inst. Pasteur)*, 132E: 261-270.
- PLUS, N., VEYRUNES, J.C., and CAVALLORO, R., 1981.- Endogenous viruses of *Ceratitis capitata* Wied. "J.R.C. Ispra strain" and *C. capitata* permanent cell lines. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 1981, 192E: 91-100.
- PROKOPY, R.J., HANIOTAKIS, G.E., and ECONOMOPOULOS, A.P., 1975b.- Comparative behavior of lab-cultured and wild-type *Dacus oleae* flies in the field.-In: *Controlling Fruit Flies by the Sterile - Insect Technique*, IAEA, Vienna STI/PUB/392: 101-108.
- PUDNEY, M., NEWMAN, J.F.E., and BROWN N.F., 1978.- Characterization of Kawino Virus, an entero-like isolated from the mosquito *Mansonia uniformis* (Diptera, Culicidae). *J. Gen. Virol.*, 40:431-441.
- REINGANUM, C., 1982.- Small RNA insect virus: biophysical, chemical and serological properties. In "*Invertebrate Pathology and Microbial Control*". Proc. 3rd International Colloq. Invertebr. Pathol., 6-10 Sept. 1982.- Brighton United Kingdom.: 233-238.
- REINGANUM, C., O. LOUGHLIN, G.T., and HOGAN, T.W., 1970.- A monoccluded virus of the field crickets *Teleogryllus oceanicus* and *T. commodus* (Orthoptera, Gryllidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 214-220.
- REMUND, V., BOLLER, E.F., ECONOMOPOULOS, A.P., and TSITSIPIS, J.A., 1977.- Flight performance of *Dacus oleae* reared on olives and artificial diet. *Z. ang. Entomol.* 82: 330-339.
- RENNIE, J., 1923.- Polyhedral disease in *Tipula paludosa* (MEIGEN). *Proc. roy. phys. Soc.*, 20: 265-268.
- REVET, B.M., and GUELPA, B., 1979.- The genome of a baculovirus infecting *Tipula paludosa* (MEIG.) (Diptera): a high molecular weight closed circular DNA of zero superhelix density. *Virology*, 96:633-639.

- REYNOLDS, E.S., 1963.- The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17:208-212.
- RIVERS, C.F., and LONGWORTH, J.F., 1972.- A monoccluded virus of *Junonia coenia*, Nymphalidae: Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 20:369-370.
- ROBINET, M., 1848.- Manuel de l'educateur de Vers a Soie. Paris: 225, 1848.
- SAKANTANIS, K.B., 1953.- Methode d'eleavage au laboratoire de la mouche des olives (*Dacus oleae* Gmel.). *Rev. Path. Veg. Entomol. Agr. Fr.* 32: 247-257.
- ΣΑΝΤΑΣ, Α.Α., 1966.- Συμβολή εις την τεχνητήν εκτροφήν του *Dacus oleae* Gmel. (Diptera - Trypetidae). Διατριβή επί Διδακτορία, υποβληθείσα εις την Ανωτάτη Γεωπονικήν Σχολήν Αθηνών: 1-98.
- SCHERRER, R., COHEN, J., L' HARIDON, R., FEYNEROL, C., and FAYET, J.C., 1976.- Reovirus - like agents (Rotavirus) associated with neonatal calf Gastroenteritis in France. *Ann. Rech. veter.*, 7:25-31.
- SCHERER, W.F. and HURBLUT, H.S., 1967.- Nodamura virus from Japan: a new and unusal arbovirus resistant to diethyl ether and chloroform. *Amer. J. Epidemiol.*, 86: 271-285.
- SEGUY, E., 1934.- Dipteres Brachyceres. *Faune de France.* 28, Paris, Lechevalier 1-832.
- SMITH, K.M., HILS, G.J., and RIVERS, C.F., 1961.- Studies in the cross-inoculation of the *Tipula* virus. *Virology*, 13: 233-241.
- SMITH, K.M. and XEROS, N., 1954.- An unusual virus disease of a dipterous larva. *Nature*, London, 173: 866.
- SMITH, R.F. and REYNOLDS, H.T., 1967.- Principles, definitions and scope of Integrated Pest Control. In "*Proceedings of the FAO Symposium on Intergated pest control*" 11-15 October 1965, Rome, Fd. Agric. Org. U.N., 1:11-18.
- STAVRAKI-PAVLOPOULOU, H., 1967.- Essais preliminaires de lachers d' *Opius concolor* SZEPL. (Hym., Braconidae) parasite de *Dacus oleae* GMEL. (Dipt. Tripetidae) dans l' ile de Chalki 1965. *Ann. Inst. phytopath. Benaki N.S.*, 8: 23-31.
- STOLTZ, D.B., 1973.- The structure of Icosahedral Cytoplasmic Deoxyriboviruses. *J. Ultrastruct. Res.*, 43:58-74.

- STOLTZ, D.B., HILSENHOFF, W.L., and STICH, H.F., 1968.- A virus disease in *Chironomus plumosus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 12: 118-128.
- STOLTZ, D.B., and SUMMERS, M.D., 1972.- Observations on the morphogenesis and structure of a hemocytic poxvirus in the midge *Chironomus attenuatus*. *J. Ultrastruct. Res.*, 40: 581-598.
- SZYBALSKI, W., 1968.- Use of cesium sulfate for equilibrium density gradient centrifugation. In "*Methods in Enzymology*", (eds Grossman, L. & Moldave K.). New York: Academic Press. Vol XII, p.p. 330-360.
- TENINGES, D., OHANESSIAN, A., RICHARD-MOLARD, E., and CONTAMINE, D., 1979.- Contamination and persistent infection of *Drosophila* cell lines by reovirus type particles. *In vitro*, 15: 425-428.
- TSIROPOULOS, G.J., 1983.- Microflora associated with wild and laboratory reared adult olive fruit flies, *Dacus oleae*, (Gmel.). *Z. ang. Entomol.*, 96: 337-340.
- TSITSIPIS, J.A., 1975.- Mass rearing of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel) at "Democritos". In "*Controlling Fruit Flies by the Steril - Insect Technique*". IAEA, Vienna, STI/PUB./392:93-100.
- ΤΣΙΤΣΙΠΗΣ, Ι.Α., 1981.- Η επίδραση των παραγόντων του περιβάλλοντος, θερμοκρασία, υγρασία, φώς, στο δάκο της ελιάς, *Dacus oleae* (Gmelin) και η βελτίωση της τεχνητής εκτροφής του. *Διατριβή για Υψηγεία*, Αθήνα, 1981: σελ 1-163.
- TURINETTI, L., 1922.- Contribution a l' etude de la mouche des olives. Appareil buccal et respiratoire de la larve. *Ann. Epiph.*, VIII, 5:293-302.
- TZANAKAKIS, M.E., 1967.- Cotrol of the Olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmel., with radiation or chemical sterilization procedures. *Final Technical Report at the "Democritus" Nuclear Research Center, Greece.*
- TZANAKAKIS, M.E., PROPHETOU, D.A., SAVOPOULOU, M.C., and KORDELAS, A.G., 1975.- Inhibition of larval Growth of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae) by Streptomycin I. Effect of duration of olive fruit immersion, temperature and Chemical additives on inhibition; effective site of topical application on oviposited olives. *Ent. exp. and appl.* 18: 302-312.

- TZANAKAKIS, M.E., and STAVRINIDES, A.S., 1973.- Inhibition of development of larvae of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae), in olives treated with streptomycin. *Ent. exp. and appl.* 16:39-47.
- VAGO, C., 1966.- A virus disease in *Crustacea-Nature*, London, 209: 1290.
- VAIL, P.V. and JAY, D.L., 1973.- Pathology of a Nuclear Polyhedrosis Virus of the Alfalfa Looper in Alternate Hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 21: 198-204.
- van den BOSCH, R., 1967.- The role of parasites and predators in Integrated Control. Proceedings of the FAO Symposium on Integrated Pest Control, 11-15 October 1965. Rome Fd. Agric. Org. U.N. 1966, 2:143-148.
- WEISER, J., 1949.- Deux nouvelles infections a virus des insectes. *Ann. Parasitol Fr.*, 24: 259-264.
- WEISER, J., 1969.- A pox-like virus in the midge *Camptochironomus tentans*. *Acta virol.*, 13: 549-553.
- WEISER, J., 1978.- A new host, *Simulium argyreatum*, for the cytoplasmic polyhedrosis virus of blackflies in Czechoslovakia. *Fol. Parasitol.*, 25: 361-365.
- WILLIAMS, R.C., and SMITH, K.M., 1958.- The polyedral form of the *Tipula iridescent virus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 28:464-469.
- WRIGLEY, N.G., 1968.- An electron microscope study of the structure of *Sericesthis iridescent virus*. *J. Gen. Virol.*, 5:123-134.
- XEROS, N.G., 1954.- A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*. *Nature*, London, 174:562.
- YAMVRIAS, C., PANAGOPOULOS, C.G., and PSALLIDAS, P.G., 1970.- Preliminary study of the internal bacterial flora of the olive fruit fly (*Dacus oleae* GMELIN). *Ann. Inst. Phytopath. Benaki*, N.S. 9, 201.206.
- ZACHOS, Δ.Γ., ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ, Χ.Γ., ΘΑΝΑΣΟΥΛΟΠΟΥΛΟΣ, Κ.Κ., ΜΠΙΡΗΣ, Δ.Α., και ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ, Π.Η., 1984.- Λεξικό Φυτοπαθολογικών Ορων. Εκδ. Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, Αθήνα: 1-110.
- ΨΥΛΛΑΚΗΣ, Ν. 1976 - "Η Ελαία εις την Ελλάδα", Εκδ. Οργανωτικής Επιτροπής της 3ης Συνόδου της Επιτροπής Ελαιοκομικής Παραγωγής του FAO, ΧΑΝΙΑ, 1976.