

**Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Η ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΟΣ
ΣΠΟΡΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΑΡΑΚΑ**

**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΜΕΓΑ ΕΛΕΝΗ
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΑΥΓΕΛΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 1. Ιώσεις που μεταφέρονται με το σπόρο	
1. Ο ιός του πρώιμου καστανώματος του αρακά	2
2. Ο ιός του σπορομεταδιδόμενου μωσαϊκού του αρακά	6
3. Ο ιός της νέκρωσης του στελέχους του αρακά	9
Κεφάλαιο 2. Πειραματικό Μέρος	
1. Έλεγχος σποροφύτων	10
2. Μελέτη του σπορομεταδιδόμενου ιού	17
2.1. Εύρος ξενιστών	17
2.2. Ιδιότητες του ιού	28
2.2.1. Οριακή αραίωση	28
2.2.2. Διατήρηση του χυμού του ιού	28
2.3. Κάθαρση	29
2.3.1. Ανάλυση των ιολογικών παρασκευασμάτων	32
2.4. Ηλεκτρονική μικροσκοπία	35
2.5. Ορολογικές δοκιμές	37
Γενικά Συμπεράσματα	40
Βιβλιογραφία	42

Ο προληπτικός φυτουγειονομικός έλεγχος των σπόρων των καλλιεργούμενων φυτών αποτελεί πλέον προϋπόθεση για την εμπορία στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Ο αρακάς, ένα είδος που καλλιεργείται και καταναλώνεται ευρέως στη χώρα μας, έχει σημαντικές ασθένειες που διαιωνίζονται με το σπόρο του. Ιδιαίτερα όσον αφορά τις ιώσεις, ο ιός του πρώιμου καστανώματος του αρακά (*Pea early – browning tobravirus, PEBV*) που μεταφέρεται με τους σπόρους και μεταδίδεται με νηματώδεις του γένους *Trichodorus* αποτελεί σοβαρό πρόβλημα στις καλλιέργειες αρακά στην Ευρώπη.

Στα πλαίσια ενός προγράμματος ιολογικού ελέγχου σπορομερίδων αρακά απομονώθηκε ένας ιός διαφορετικός από τον προηγούμενο. Επειδή θεωρήθηκε χρήσιμη η μελέτη ταυτοποίησής του, η όλη διαδικασία που οδήγησε στην αναγνώρισή του, περιλαμβάνεται στην παρούσα πτυχιακή μελέτη.

ΙΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΜΕΤΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΣΠΟΡΟ

1. Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΚΑΣΤΑΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΡΑΚΑ (*Pea early – browning tobravirus*)

Αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Bos & Van der Want το 1962 στην Ολλανδία.

1.1. Συμπτώματα στον αρακά

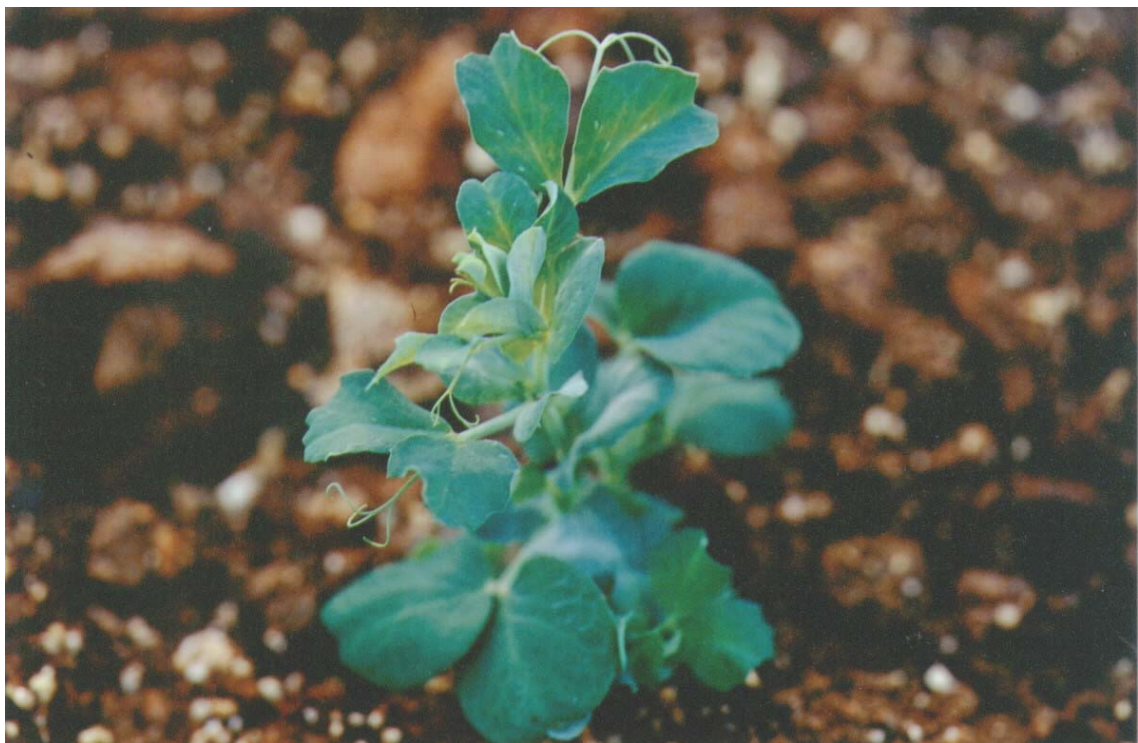
Τα συμπτώματα που προκαλεί ο ιός είναι: μεγάλα νεκρωτικά τμήματα που αναπτύσσονται στα παράφυλλα και στα φυλλάρια, νεκρωτικές ραβδώσεις στα στελέχη και μωσαϊκό στα φύλλα. Η νέκρωση είναι συνήθως περιορισμένη, όμως είναι πιθανό όλο το τμήμα του βλαστού να νεκρωθεί.

Ακόμη τα φύλλα παρουσιάζουν διασυστηματική λανθάνουσα μόλυνση, δυσμορφία και τα φυτά δεν αναπτύσσονται κανονικά (Εικόνα 1).

Τέλος οι φλοιοί των καρπών μερικές φορές εμφανίζουν νεκρωτικές περιοχές.

1.2. Γεωγραφική κατανομή

Είναι διαδομένος στο Βέλγιο, στην Ιταλία, στο Μαρόκο, στην Ολλανδία, στη Σουηδία και στην Αγγλία.



Εικόνα 1. Σπορόφυτο αρακά μολυσμένο με τον ιό του πρώιμου καστανώματος του αρακά.

1.3. Ξενιστές στη φύση

Φυσικούς ξενιστές έχει τον αρακά (*Pisum sativum*) και το φασόλι (*Phaseolus vulgaris*).

1.4. Μετάδοση με φορείς

➤ Διαμέσου του σπόρου

Μεταδίδεται με το σπόρο σε ποσοστό μέχρι 37% στον αρακά (*Pisum sativum*) της ποικιλίας Rondo. Οι μολυσμένοι σπόροι εμφανίζονται ρυτιδωμένοι και παρουσιάζουν ανομοιομορφία στο χρωματισμό.

➤ Με νηματώδεις

Ο ιός στη φύση έχει φορείς τους νηματώδεις *Trichodoridae* και συγκεκριμένα στην Ολλανδία μεταδίδεται με τους *Trichodorus teres* και *Trichodorus pachydermus* και στην Αγγλία με τους *T. anemone*, *T. primitivus* και *T. viruliferus* (Εικόνα 2).

1.5. Μορφολογία ισωματίων

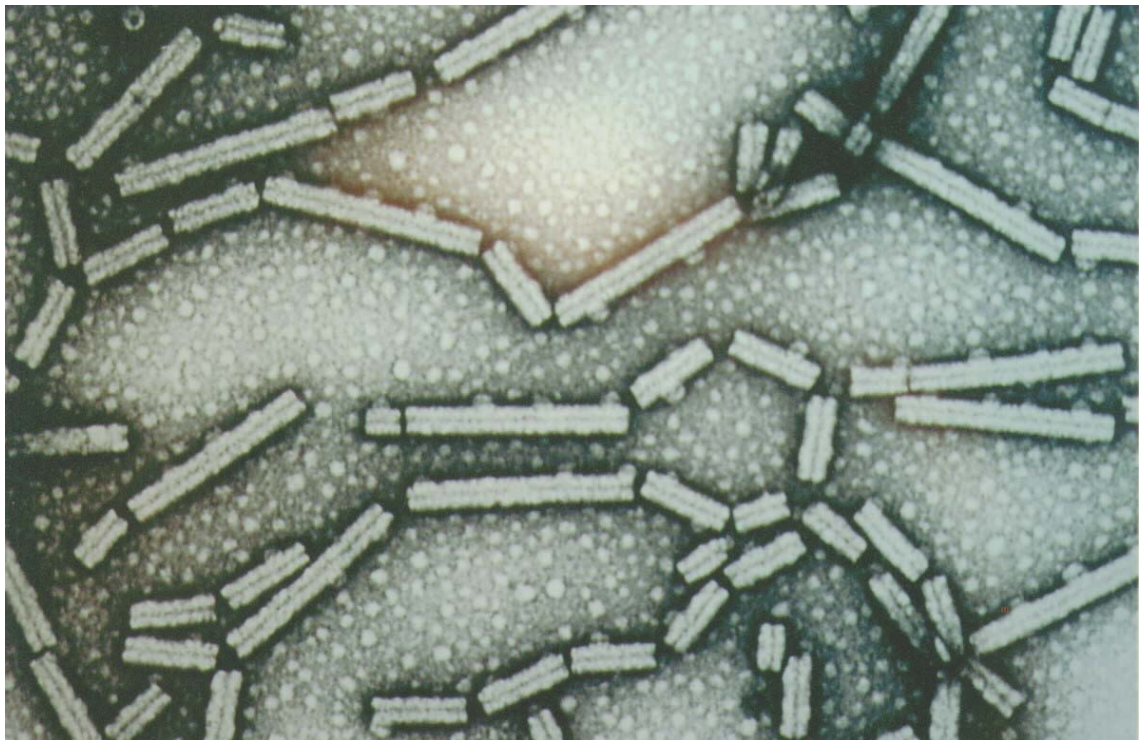
Τα ισωμάτια είναι ραβδόμορφα, τριών κλάσεων με μέσο όρο μήκους 215nm, 207nm και 105nm. Το πλάτος των ισωματίων είναι περίπου 21nm (Εικόνα 3).

Τα ισωμάτια του ιού αποτελούνται από μονόκλωνο RNA, M.Wt 2.5×10^6 (Long ισωμάτια) και 1.3×10^6 (Short ισωμάτια).

Η καψιδιακή πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 24.000



Εικόνα 2. Νηματώδεις του γένους *Trichodorus* φορείς του ιού του πρώιμου καστανώματος του αρακά.



Εικόνα 3. Ισοσώματα του ιού του πρώιμου καστανώματος του αρακά.

2. Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΣΠΟΡΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΟΥ ΜΩΣΑΪΚΟΥ ΤΟΥ ΑΡΑΚΑ

(Pea seed-borne mosaic potyvirus)

Αναφέρθηκε για πρώτη φορά από το Musil το 1966 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής.

2.1. Συμπτώματα στον αρακά

Παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη των φυτών που εκδηλώνεται σε διάφορους βαθμούς στα περισσότερα καλλιεργούμενα είδη του *Pisum sativum*.

Ο ιός προκαλεί καρούλιασμα των φυλλαρίων προς τα κάτω, ενώ τα φύλλα παίρνουν σκούρο πράσινο χρώμα και τα φυλλάρια διπλώνουν, καρουλιάζουν και τα νεύρα αποχρωματίζονται και λεπταίνουν.

Ακόμη τα πρώιμα μολυσμένα φυτά ή αυτά που προέρχονται από μολυσμένους σπόρους δεν σχηματίζουν άνθη. Εάν σχηματίσουν τότε αυτά εμφανίζουν μαρασμό, είναι παραμορφωμένα και συχνά δεν είναι γόνιμα. Οι σπόροι είναι μικροί σε μέγεθος και εμφανίζουν παραμορφώσεις.

Τέλος, το περίβλημα των σπόρων μπορεί να σχίζεται καθώς ωριμάζουν.

2.2. Γεωγραφική κατανομή

Ο ιός διαδίδεται στην περιοχή της Κεντρικής και της Ανατολικής Ασίας, στη Νότια Αμερική, στην Αυστραλία και στην Αγγλία. Ακόμη βρέθηκε και στη Νέα Ζηλανδία.

2.3. Ξενιστές στη φύση

Τα καλλιεργούμενα είδη του γένους *Pisum* είναι οι κύριοι φυσικοί ξενιστές.

2.4. Μετάδοση με φορείς

➤ Με αφίδες

Ο ιός μεταδίδεται με μη - έμμοно τρόπο με φορείς τις αφίδες *Acyrtosiphon pisum*, *Dactynotus escalanti*, *Macrosiphum crataegarius*, *Rhopalosiphum padi*, *Aphis craccivora* και *Aphis fabae* που ανήκουν στην οικογένεια *Aphididae*.

➤ Με το σπόρο

Ο ιός μεταδίδεται διαμέσου του σπόρου σε ποσοστό μέχρι 30% από φυτά του αρακά που έχουν μολυνθεί πριν το στάδιο της άνθησης, ενώ δεν μεταδίδεται από φυτά που έχουν μολυνθεί μετά την έναρξη της άνθησης. Ακόμη βρέθηκε ότι εμπορικοί σπόροι περιείχαν μέχρι και 90% μολυσμένους.

Η μετάδοση του ιού με σπόρους με σχισμένο περίβλημα ποικίλλει από 0 έως 100%.

Λιγότερο από το 1% των σπόρων μολύνθηκαν από τη γονιμοποίηση με γύρη που προήλθε από μολυσμένο φυτό.

2.5. Μορφολογία ιοσωματίων

Τα ιοσωμάτια είναι νηματοειδή με μέσο όρο μήκους 770nm και πλάτος 12nm (Εικόνα 4).

Τα ιοσωμάτια περιέχουν 5,3% νουκλεϊκό οξύ και 94% πρωτεΐνη.



Εικόνα 4. Ισσωμάτια του ιού του σπορομεταδιδόμενου μωσαϊκού του αρακά.

3. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ ΑΡΑΚΑ (*Pea stem necrosis virus*)

Αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1976, όπου δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία.

3.1. Συμπτώματα στον αρακά

Τα συμπτώματα που προκαλεί ο ιός στο φυτό του αρακά είναι: κίτρινισμα και νεκρώσεις στα φύλλα και στο στέλεχος.

3.2. Γεωγραφική κατανομή

Ο ιός είναι αρκετά διαδομένος στην Ιαπωνία.

3.3. Ξενιστές στη φύση

Φυσικός ξενιστής είναι μόνο ο αρακάς (*Pisum sativum*).

3.4. Μετάδοση με φορείς

Ο ιός μεταδίδεται με τον μύκητα *Olpidium spp.* που ανήκει στην τάξη *Plasmodiophorales* .

Ακόμη μπορεί να μεταδοθεί με το σπόρο.

3.5. Μορφολογία ιοσωματίων

Τα ιοσωμάτια είναι ισοδιαμετρικά, (διάμετρος 34nm), και περιέχουν 15% νουκλεϊκό οξύ και 85% πρωτεΐνη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΠΟΡΟΦΥΤΩΝ (SEEDLING TEST)

Ο έλεγχος αφορούσε τρεις ποικιλίες αρακά (Geneva, Karina και Puget) από τις οποίες φυτέψαμε ξεχωριστά κάθε σπόρο σε πλαστικά γλαστράκια με απολυμασμένο μίγμα χώματος τύρφης και άμμου, τα οποία παρέμειναν σε χώρο θερμοκηπίου (Εικόνα 5).

Από κάθε ποικιλία σπάρθηκαν διαδοχικά 1200 σπόροι. Μετά τη βλάστηση τα σπορόφυτα ελέγχονταν μακροσκοπικά για εκδήλωση αλλοιώσεων στο χρώμα και σχήμα του φύλλου, καθώς και στην ανάπτυξη του φυτού (Εικόνα 6,7). Τα ύποπτα σπορόφυτα καταγράφονταν και μεταφέρονταν σε ξεχωριστό χώρο του θερμοκηπίου (Εικόνα 8,9,10).

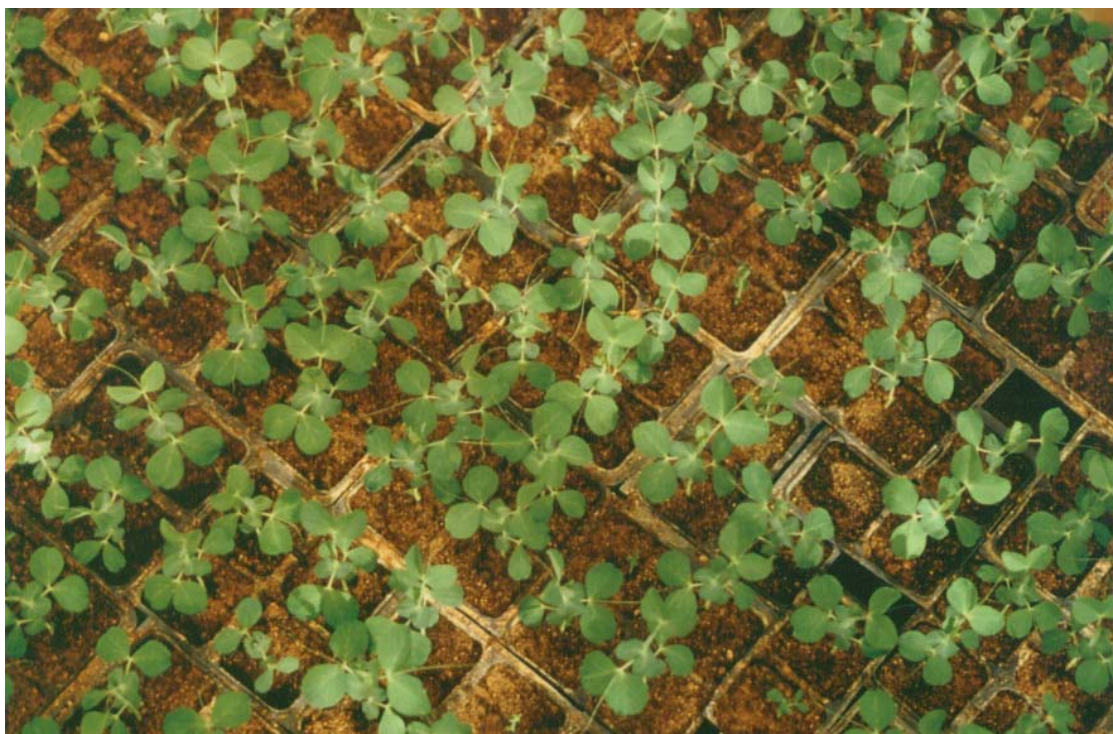
Διαδοχικά και ένα-ένα υφίστατο βιολογικό έλεγχο και ορισμένα μεταφυτεύονταν σε γλάστρες των 15 L προκειμένου να ολοκληρώσουν το βιολογικό κύκλο τους (παραγωγή σπόρου).

Ο βιολογικός έλεγχος γινόταν με μηχανική μετάδοση σε φυτοδείκτες με ομογενοποίηση συμπτωματικών φύλλων φυταρίων αρακά σε απολυμασμένο γουδί πορσελάνης παρουσία 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$), pH 7,2.

Το φυτικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση φυτών που ανήκαν σε διάφορες οικογένειες. Οι φυτοδείκτες προήλθαν από σπορεία σε ειδικό υπόστρωμα και μεταφύτευση σε γλαστράκια με μίγμα απολυμασμένου με ατμό χώματος, τύρφης και άμμου.



Εικόνα 5. Έλεγχος σποροφύτων αρακά, (κάτω) λίγες μέρες μετά την σπορά, (πάνω) στο στάδιο του πρώτου μακροσκοπικού ελέγχου.



Εικόνα 6. Σπορόφυτα ποικιλίας *Geneva* στο στάδιο του κύριου μακροσκοπικού ελέγχου (τα ύποπτα σπορόφυτα με βέλος).



Εικόνα 7. Κοντινό πλάνο της Εικόνας 6.



Εικόνα 8. Ύποπτα σπορόφυτα πριν από τον βιολογικό έλεγχο.



Εικόνα 9. Σπορόφυτο της ποικιλίας *Karina* (αλπινό).



Εικόνα 10. Σπορόφυτο της ποικιλίας *Puget* (χίμαιρα).

Οι μολύνσεις των φυτών πραγματοποιήθηκαν με τριβή με βαμβακοφόρους, αφού πρώτα τα φύλλα σκονίστηκαν με γη διατόμων για τη δημιουργία μικροπληγών. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με νερό για να αποφευχθεί τοξικότητα από οξείδωση του χυμού.

Μετά τη μόλυνση τα φυτά παρέμειναν σε εργαστηριακό θερμοκήπιο με ρυθμιζόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού.

Τα αποτελέσματα από τον μακροσκοπικό έλεγχο των σπόρων παρατίθεται στον Πίνακα 1. Από την ποικιλία *Karina* βλάστησαν 1167 σπόροι και εμφάνισαν ύποπτα συμπτώματα τρία φυτά. Στην ποικιλία *Geneva* βλάστησαν 1170 σπόροι και ύποπτα συμπτώματα εμφανίστηκαν σε επτά φυτά. Τέλος στην ποικιλία *Puget* βλάστησαν 1175 σπόροι και τέσσερα φυτά είχαν ύποπτα συμπτώματα.

Πίνακας 1. Μακροσκοπικά αποτελέσματα ελέγχου 3600 σποροφύτων αρακά.

Ποικιλίες	Αριθμός σπόρων	Αριθμός σποροφύτων	Φυτά με ύποπτα συμπτώματα
<i>Karina</i>	1200	1167	3
<i>Geneva</i>	1200	1170	7
<i>Puget</i>	1200	1175	4

Από τα 14 ύποπτα σπορόφυτα μόνο ένα έδωσε συμπτώματα σε ορισμένους φυτοδείκτες. Συγκεκριμένα απομονώθηκε ένας σπορομεταδιδόμενος ιός από φυτάριο αρακά της ποικιλίας *Geneva*. Ο σπορομεταδιδόμενος ιός διατηρήθηκε στο φυτοδείκτη *C. quinoa*, ο οποίος

αποτελέσει τη πηγή του ιϊκού μολύσματος για τις μελέτες που ακολούθησαν (Εικόνα 11). Στη συνέχεια ο ιός θα αναφέρεται ως ιός G του αρακά.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΠΟΡΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΟΥ ΙΟΥ

2.1. ΕΥΡΟΣ ΞΕΝΙΣΤΩΝ

Οι δοκιμές μηχανικής μετάδοσης σε ευρύτερη κλίμακα φυτοδεικτών πραγματοποιήθηκαν με ομογενοποίηση συμπτωματικών φύλλων φυτών *C. quinoa* σε απολυμασμένο γουδί πορσελάνης παρουσία 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$), pH 7,2.

Το φυτικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση φυτών που ανήκαν σε διάφορες οικογένειες. Οι φυτοδείκτες προήλθαν από σπορεία σε ειδικό υπόστρωμα και μεταφύτευση σε γλαστράκια με μίγμα απολυμασμένου με ατμό χώματος, τύρφης και άμμου.

Οι μολύνσεις των φυτών πραγματοποιήθηκαν με τριβή με βαμβακοφόρους, αφού πρώτα τα φύλλα σκονίστηκαν με γη διατόμων για τη δημιουργία μικροπληγών. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με νερό για να αποφευχθεί πιθανή τοξικότητα από οξείδωση του χυμού.

Μετά τη μόλυνση τα φυτά παρέμειναν σε εργαστηριακό θερμοκήπιο με ρυθμιζόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού. Καθημερινά γινόταν μακροσκοπικός έλεγχος και καταγραφή των συμπτωμάτων.

Στις παραπάνω δοκιμές μηχανικής μετάδοσης χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα φυτοδεικτών διαπιστώθηκε ότι ο ιός έχει μέτριο εύρος ξενιστών, καθώς μόλυνε 28 από τα 42 φυτικά είδη διαφόρων οικογενειών (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Εύρος ξενιστών του σπορομεταδιδόμενου ιού του αρακά.

Ξενιστής	Συμπτώματα	
	Τοπικά	Διασυστηματικά
Gramineae		
<i>Zea mays</i>	-	-
<i>Avena sativa</i>	-	-
<i>Triticum durum</i>	-	-
Leguminosae		
<i>Vicia faba cv. Aqua Dolce</i>	LLN	-
<i>Lupinus albus</i>	LLN	-
<i>Phaseolus vulgaris cv. Bountiful</i>	LLN	-
<i>Phaseolus aureus</i>	LLN	-
<i>Vigna sinensis</i>	LLN	-
<i>Pisum sativum cv. Puget</i>	-	-
<i>Pisum sativum cv. Geneva</i>	-	SSL
<i>Pisum sativum cv. Karina</i>	-	-
<i>Pisum sativum cv. Rondo</i>	-	-
Solanaceae		
<i>Datura metel</i>	-	-
<i>Nicotiana rustica</i>	LLN	-
<i>Nicotiana tabacum cv. Xanthi nc</i>	LLN	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	LLN	-

<i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>Samsun</i>	LLN	SSM
<i>Nicotiana cavicola</i>	LLN	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	LLN	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	LLN	-
<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. <i>Belladonna</i>	-	-
<i>Petunia hybrida</i>	LLN	-
<i>Solanum nigrum</i>	-	SSM
Cucurbitaceae		
<i>Cucumis melo</i>	LLN	-
<i>Cucurbita pepo</i>	LLN	-
<i>Cucumis sativus</i>	LLN	-
Compositae		
<i>Calendula officinalis</i>	-	-
<i>Lactuca sativa</i> cv. <i>Romana</i>	-	-
<i>Lactuca sativa</i> cv. <i>Grenada</i>	-	-
<i>Lactuca sativa</i> cv. <i>Nora Blond</i>	-	-
<i>Zinnia elegans</i>	-	-
Caryophyllaceae		
<i>Dianthus barbatus</i>	-	-
Amaranthaceae		
<i>Gomphrena globosa</i>	LLN	-
Chenopodiaceae		
<i>Spinacia oleracea</i> cv. <i>Viroflay</i>	-	-

<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LLN	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	LLN	-
Cruciferae		
<i>Brassica oleracea var capitata</i>	-	-
<i>Brassica oleracea var botrytis</i>	-	-
Umbelliferae		
<i>Apium graveolens</i>	-	-

LLN: τοπικές νεκρωτικές κηλίδες

SSM: διασυστηματική μόλυνση

SSL: λανθάνουσα διασυστηματική μόλυνση

-: δεν μολύνθηκε

Στην οικογένεια *Chenopodiaceae*, εμφάνισαν τοπικά συμπτώματα (τοπικές νεκρωτικές κηλίδες) τα είδη *Chenopodium amaranticolor* και *Chenopodium quinoa* (Εικόνα 11).

Στην οικογένεια *Leguminosae* το *Phaseolus vulgaris* cv. *Bountiful* εμφάνισε ως κύριο σύμπτωμα νεκρωτικές κηλίδες (Εικόνα 12) όπως και στην οικογένεια *Cucurbitaceae* τα είδη *Cucumis melo* (Εικόνα 13), *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus*.

Ο φυτοδείκτης *Gomphrena globosa* της οικογένειας *Amaranthaceae* παρουσίασε τοπικές νεκρωτικές κηλίδες (Εικόνα 14).

Από την οικογένεια *Solanaceae* ο φυτοδείκτης *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun* παρουσίασε διασυστηματική μόλυνση (Εικόνα 15) όπως και το είδος *Solanum nigrum* (Εικόνα 16). Ο φυτοδείκτης *Nicotiana rustica* εμφάνισε τοπικές νεκρωτικές κηλίδες (Εικόνα 17).

Από τις τρεις ποικιλίες του αρακά μόνο η ποικιλία *Geneva* εμφάνισε λανθάνουσα διασυστηματική μόλυνση.

Από τις οικογένειες *Gramineae*, *Compositae*, *Caryophyllaceae*, *Cruciferae* και *Umbelliferae* δεν προσβλήθηκε κανένα από τα χρησιμοποιηθέντα είδη.



Εικόνα 11. Ο φυτοδείκτης *Chenopodium quinoa* με τυπικά συμπτώματα του ιού G του αρακά.



Εικόνα 12. Ο φυτοδείκτης *Phaseolus vulgaris* της ποικιλίας *Bountiful* με τοπικά νεκρωτικά συμπτώματα.



Εικόνα 13. Τοπικά συμπτώματα στις κοτυληδόνες του φυτοδείκτη *Cucumis melo*.



Εικόνα 14. Τοπικά νεκρωτικά συμπτώματα στο φυτοδείκτη *Gomphrena globosa*.



Εικόνα 15. Διασυστηματικά συμπτώματα του ιού G του αρακά στο φυτοδείκτη *Nicotiana tabacum* της ποικιλίας *Samsun*.



Εικόνα 16. Διασυστηματικά συμπτώματα έντονου μωσαϊκού στο φυτοδείκτη *Solanum nigrum*.



Εικόνα 17. Τοπικές νεκρωτικές κηλίδες σε φύλλο του φυτοδείκτη *Nicotiana rustica*.

2.2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

2.2.1. Οριακή αραίωση

Φύλλα από μολυσμένα φυτά *C. quinoa* ομογενοποιήθηκαν σε απολυμασμένο γουδί πορσελάνης και ο χυμός διηθήθηκε διαμέσου διπλού στρώματος γάζας. Έγιναν οι εξής αραιώσεις του μολυσμένου χυμού με 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$), pH 7,2: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} και 10^{-13} . Οι αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν αμέσως για την μηχανική μετάδοση φυτών *C. quinoa* που αντιδρούν με την εμφάνιση τοπικών νεκρωτικών κηλίδων.

Ο ιός τελικά εμφάνισε ικανοποιητική συγκέντρωση μολυσματικών σωματιδίων καθώς ο χυμός παρέμεινε μολυσματικός μέχρι και την αραιωση 10^{-13} .

2.2.2. Διατήρηση του χυμού του ιού

Εκχύλισμα από μολυσμένα φυτά *C. quinoa* τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι κλείστηκαν με parafilm και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Καθημερινά και για 15 ημέρες περίπου γινόταν μολύνσεις φυτών *C. quinoa*. Ο ιός εμφανίζεται με μεγάλη διάρκεια ζωής καθώς παρέμεινε μολυσματικός για 15 ημέρες (όση η διάρκεια της δοκιμής).

2.3. ΚΑΘΑΡΣΗ

Η ολοκληρωμένη ταυτοποίηση ενός ιού στηρίζεται κυρίως στα αποτελέσματα δοκιμών που γίνονται στο εργαστήριο με την εφαρμογή διαδικασιών που απαιτούν τεχνολογικό εξοπλισμό και απαραίτητα καθαρά παρασκευάσματα του ιού, τα οποία θα πρέπει να λαμβάνονται εύκολα και σε επαρκή ποσότητα.

Για την κάθαρση του ιού του αρακά χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής πολλαπλασιασμού του ιού φυτοδείκτης *C. quinoa*.

Τα σπορεία και οι μεταφυτεύσεις έγιναν στο εργαστηριακό θερμοκήπιο. Για τη μεταφύτευση χρησιμοποιήθηκαν μικρές πλαστικές γλάστρες που περιείχαν απολυμασμένο μίγμα χώματος, τύρφης και άμμου.

Τα φυτά μολύνθηκαν μηχανικά στο στάδιο των οκτώ αναπτυγμένων φύλλων και συλλέχθηκαν 10-12 ημέρες μετά τη μόλυνση, όταν παρουσίαζαν τα τυπικά συμπτώματα.

Μετά τη συλλογή και μέχρι να χρησιμοποιηθούν στη κάθαρση διατηρήθηκαν σε πλαστικές σακούλες σε θερμοκρασία 4 °C.

Η διαδικασία εξαγωγής και κάθαρσης ήταν η εξής (Πίνακας 3): μολυσμένα φύλλα *C. quinoa* ομογενοποιήθηκαν παρουσία 0,5 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων pH 7,2 και 0,5% Mercaptoethanole. Ο χυμός διηθήθηκε διαμέσου διπλού στρώματος γάζας ώστε να κρατηθούν τα μεγαλύτερα φυτικά συστατικά.

Ακολούθησε προσθήκη 8% βουτανόλης και το μίγμα αναδεύτηκε στους 4 °C για 15 λεπτά.

Κατόπιν έγινε φυγοκέντρηση του χυμού στις 8.000 στροφές/λεπτό για 30 λεπτά με την κεφαλή GSA της προπαρασκευαστικής φυγοκέντρου Sorvall RC 5C.

Το υπερκείμενο αιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 35000 στροφές/λεπτό για 50 λεπτά με την κεφαλή T 865 της υπερφυγοκεντρου Sorvall Ultra 80.

Στο ίζημα προστέθηκαν 2 ml/σωλήνα 0.05 M φωσφορικού διαλύματος pH 7,2, αναδεύτηκε και υποβλήθηκε σε νέο κύκλο φυγοκεντρήσεων.

Το ίζημα της τελευταίας φυγοκέντρωσης αποτέλεσε το μερικώς καθαρό παρασκεύασμα του ιού.

Πίνακας 3. Μέθοδος κάθαρσης του ιού G του αρακά.

X gr μολυσμένος φυτικός ιστός

2 X ml 0,5 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,2

0,5% 2 Mercaptoethanole

Ομογενοποίηση

Διήθηση διαμέσου γάζας

Προσθήκη 8% βουτανόλης

Ανάδευση στους 4 °C για 15 λεπτά

Φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές/λεπτό για 30 λεπτά

ΙΖΗΜΑ

Απορρίπτεται

ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ

Φυγοκέντρηση στις 35000 στροφές/λεπτό για 50 λεπτά

ΙΖΗΜΑ

Προσθήκη 0,05 M φωσφορικού διαλύματος
Φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές/λεπτό για 30 λεπτά

ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ

Απορρίπτεται

ΙΖΗΜΑ

Απορρίπτεται

ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ

Φυγοκέντρηση στις 35000 στροφές/λεπτό για 50 λεπτά

ΙΖΗΜΑ

Μερικώς καθαρό παρασκεύασμα

ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ

Απορρίπτεται

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΘΑΡΣΗΣ

Η μέθοδος που επιλέχθηκε έδωσε ίζημα στην τελευταία υψηλή φυγοκέντρηση μεγέθους φακής, που σε δοκιμές μολυσματικότητας στο φυτοδείκτη *C. quinoa* έδειξε υψηλή μολυσματικότητα.

Μετά την αιώρηση του ιζήματος σε 0,02 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH 7,2, το σκεύασμα χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω αναλύσεις.

2.3.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Ανάλυση σε στήλες διαβαθμισμένης πυκνότητας σακχαρόζης

Τα μερικώς καθαρά παρασκευάσματα του ιού όταν χρησιμοποιούνται σε φασματοφωτομετρικές αναλύσεις και οροδιαγνωστικές δοκιμές παρέχουν στοιχεία που δεν εγγυώνται την επαναληψιμότητα καθώς η παρουσία διαφόρων φυτικών συστατικών αλλοιώνει σημαντικά τις ενδείξεις. Για τη λήψη καθαρών παρασκευασμάτων, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανάλυσης των μερικώς καθαρών παρασκευασμάτων σε στήλες διαβαθμισμένης πυκνότητας σακχαρόζης.

Οι στήλες διαβαθμισμένης πυκνότητας σακχαρόζης αποτελούνται από σωλήνες φυγοκέντρησης, που περιέχουν διαλύματα σακχαρόζης με πυκνότητα που αυξάνει από την κορυφή προς τον πυθμένα και επιτρέπουν το διαχωρισμό των ιοσωματίων από τα κυτταρικά συστατικά. Ο διαχωρισμός βασίζεται στο διαφορετικό μέγεθος και βάρος των ιοσωματίων σε σχέση με εκείνα των κυτταρικών συστατικών.

Τα μερικώς καθαρά παρασκευάσματα του ιού φυγοκεντρήθηκαν σε στήλες σακχαρόζης 10-40% στις 25000 στροφές/λεπτό για 2 ώρες με την κεφαλή αιωρούμενων βραχιόνων AH-628 στην υπερφυγόκεντρο Sorvall Ultra 80. Η διαβάθμιση πραγματοποιήθηκε με κατάψυξη διαλύματος σακχαρόζης 25% σε 0.05 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,2 σε σωλήνες φυγοκέντρησης. Μετά την απόψυξη στην κορυφή κάθε σωλήνα τοποθετήθηκε 1 ml μερικώς καθαρού παρασκευάσματος.

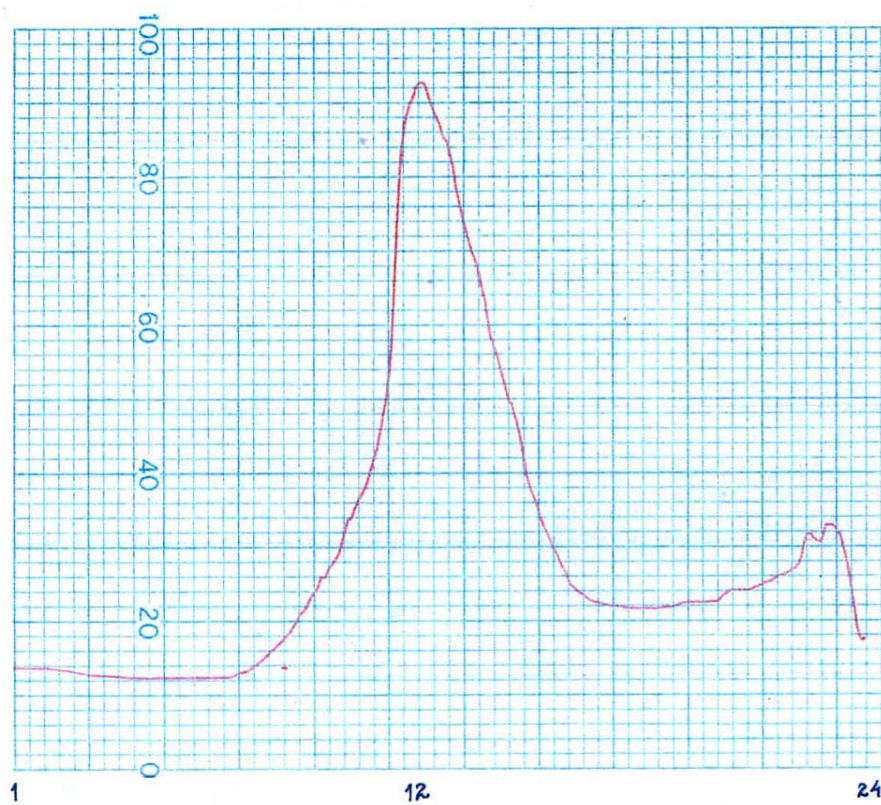
Μετά την φυγοκέντρηση, οι σωλήνες αναλύθηκαν στο υπεριώδες φως(254 nm) σε κλασματοποιητή διαβαθμισμένης πυκνότητας ISCO.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το μερικώς καθαρό παρασκεύασμα έδωσε διάγραμμα καθίζησης με μια κύρια ζώνη (Εικόνα 18).

Η ζώνη που συλλέχθηκε αραιώθηκε με 0,01 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,2 και φυγοκεντρήθηκε στις 22000 στροφές/λεπτό για μιάμιση ώρα με την κεφαλή αιωρούμενων βραχιόνων AH-628 στην υπερφυγόκεντρο Sorvall Ultra 80.

Το ίζημα αραιώθηκε σε 2 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος και αποτέλεσε το καθαρό παρασκεύασμα του ιού που χρησιμοποιήθηκε για παρατηρήσεις των ιοσωματίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και για την ταυτοποίηση με ορολογικές δοκιμές.



Εικόνα 18. Διάγραμμα καθίζησης του ιού G του αρακά σε σωλήνες διαβαθμισμένης πυκνότητας.

2.4. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Μια σταγόνα από το καθαρό παρασκεύασμα του ιού G του αρακά τοποθετήθηκε πλέγμα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου καλυμμένο με μεμβράνη άνθρακα, παραμένοντας για 10 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε χρώση με δύο σταγόνες 2% φωσφοβολφραμικό οξύ (PTA), pH 6 και παρατήρηση με φωτογράφιση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση έγινε στο Istituto di Patologia Vegetude, Ρώμη Ιταλίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε όλα τα πεδία παρατηρήθηκαν ραβδόμορφα ιοσωμάτια με διαστάσεις 13-15 nm εύρος και 280-300 nm μήκος, χαρακτηριστικά μορφολογικά στοιχεία φυτικών ιών του γένους *Tobamovirus* (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Τυπικά ραβδόμορφα ιοσωμάτια του γένους *Tobamovirus* από παρατηρήσεις του ιού G του αρακά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

2.5. ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

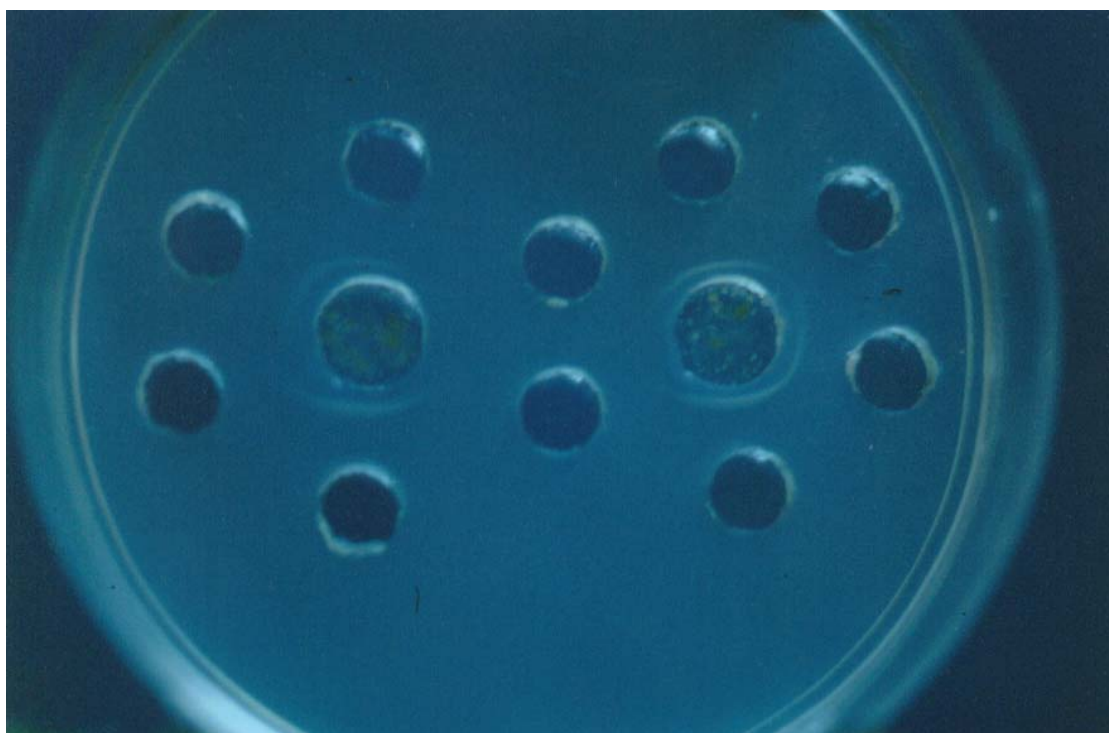
Τα μερικώς καθαρά παρασκευάσματα που συγκεντρώθηκαν από την διαδικασία της κάθαρσης χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του ιού του αρακά δια μέσου της ορολογικής δοκιμής της διπλής διάχυσης.

Οι δοκιμές έγιναν σε τρυβλία Petri που περιείχαν ένα στρώμα 6mm πηκτής (0.8% ιον agar N° 2, 0.85% NaCl και 0.02% Sodium azide).

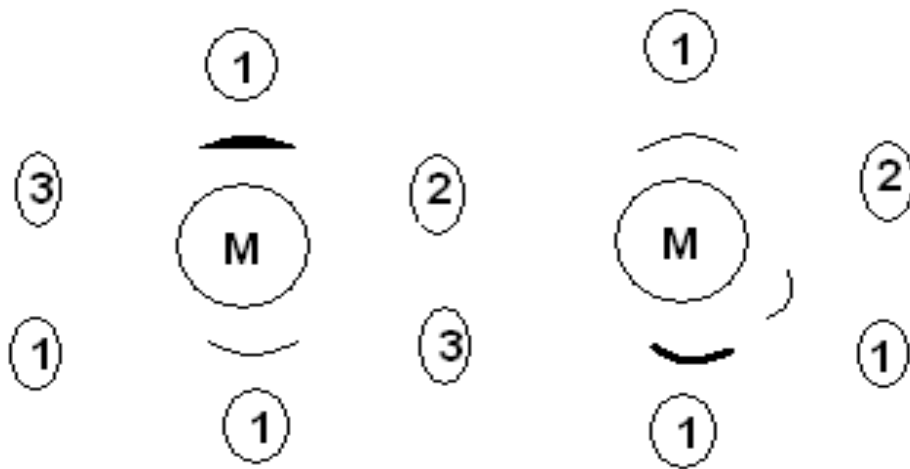
Χρησιμοποιήθηκαν αντιοροί του γένους *Tobamovirus* και ως μάρτυρας υγιής χυμός από *C. quinoa*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Θετική αντίδραση παρατηρήθηκε (Εικόνα 20) έναντι του αντιορού του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus, TMV*). Αντίθετα δεν εμφανίστηκε αντίδραση έναντι των αντιορών του ιού του μωσαϊκού της τομάτας (*Tomato mosaic virus, ToMV*) και του ιού της ήπιας ποικιλοχλώρωσης της πιπεριάς (*Pepper mild mottle virus, PMMV*).



Εικόνα 20. Αποτελέσματα της ταυτοποίησης του ιού G του αρακά με την ορολογική δοκιμή της ανοσοδιάχυσης.



Εικόνα 21. Σχηματική παράσταση της Εικόνας 20.

M: Παρασκεύασμα του ιού G του αρακά

1: Αντιοροί του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus, TMV*)

2: Αντιοροί του ιού του μωσαϊκού της τομάτας (*Tomato mosaic virus, ToMV*)

3: Αντιοροί του ιού της ήπιας ποικιλοχλώρωσης της πιπεριάς
(*Pepper mild mottle virus, PMMV*)

Το διαφορετικό πάχος στη γραμμή κατακρήμνισης δείχνει το διαφορετικό βαθμό συγγένειας.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα του πειραματικού μέρους της εργασίας προκύπτει σαφώς ότι ο ιός G του αρακά είναι ένας ιός που σχετίζεται με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus, TMV*), ένας ιός που ανήκει στο γένος *Tobamovirus* και που έχει παγκόσμια διάδοση.

Η ταυτοποίηση του ιού G του αρακά ως μία απομόνωση του ιού του μωσαϊκού του καπνού, στηρίζεται στα αποτελέσματα των συμπτωματολογικών αντιδράσεων των φυτοδεικτών, στις ιδιότητες του ιού στο μολυσμένο χυμό, στα αποτελέσματα της κάθαρσης και της ανάλυσης σε στήλες διαβαθμισμένης πυκνότητας, στις παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και κυρίως στις ορολογικές δοκιμές.

Το γεγονός ότι ο ιός απομονώθηκε από ένα και μόνο σπορόφυτο, που εμφάνισε συμπτώματα καχεκτικής ανάπτυξης και ήπιας ποικιλοχλώρωσης στα φύλλα (1/3600 σπορόφυτα), περιορίζει σαφώς την επιδημιολογική του σημασία. Επιπλέον διεθνώς στον αρακά δεν έχει επισημανθεί η παρουσία σπορομεταδιδόμενου ιού του γένους *Tobamovirus*.

Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στάθηκε σχεδόν αδύνατη η μόλυνση σποροφύτων αρακά και των τεσσάρων ποικιλιών (μόνο σε ένα από τα 50 που μολύνθηκαν διαπιστώθηκε λανθάνουσα μόλυνση) προκύπτει ότι ο ιός G του αρακά δεν συγκαταλέγεται στα παθογόνα που διαιωνίζονται με το σπόρο του αρακά.

Ο ιολογικός έλεγχος σπορομερίδων φυτών με προβλήματα ιώσεων που μεταφέρονται με το σπόρο κρίνεται απαραίτητος για να αποφευχθεί η

διάδοση σοβαρών και δύσκολων αντιμετωπιζόμενων ασθενειών στη χώρα μας ή σε μια ευρύτερη περιοχή.

Το γεγονός της απουσίας σπορομεταδιδόμενων ιών στο συγκεκριμένο έλεγχο αποτελεί εχέγγυο ότι ο υποχρεωτικός (σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης) προληπτικός έλεγχος αποδίδει καρπούς.

Η ανίχνευση του ιού G του αρακά, ενός *Tobamovirus*, με βάση τα μέχρι σήμερα γνωστά, διεθνώς και εθνικώς, στοιχεία θα μπορούσε να αποτελεί μια περίπτωση με αποκλειστικά και μόνο επιστημονικό ενδιαφέρον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Hull R., Matthew's. Plant Virology. Academic Press, London, UK.
- Tobacco mosaic Tobamovirus. 1996. IN: Viruses of Plants. Description and Lists from the Vide Database (Brunt A.A. et al. Eds), (AB International), 1251-1255.
- B. Gerhardson and K. Ryden, 1996. Pea early browning Tobravirus. IN: Viruses of Plants. Description and Lists from the Vide Database (Brunt A.A. et al. Eds), (AB International), 901-903.
- P. Fry, 1996. Pea seed-borne mosaic Potyvirus. IN: Viruses of Plants. Description and Lists from the Vide Database (Brunt A.A. et al. Eds), (AB International), 909-911.
- K. T. Natsuaki, 1996. Pea stem necrosis virus. IN: Viruses of Plants. Description and Lists from the Vide Database (Brunt A.A. et al. Eds), (AB International), 911-912.
- Harrison B. D., 1973. Pea early browning virus. IN: C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses, No. 120.
- Harrison B. D., 1973. Pea seed-borne mosaic virus. IN: C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses, No. 146.

