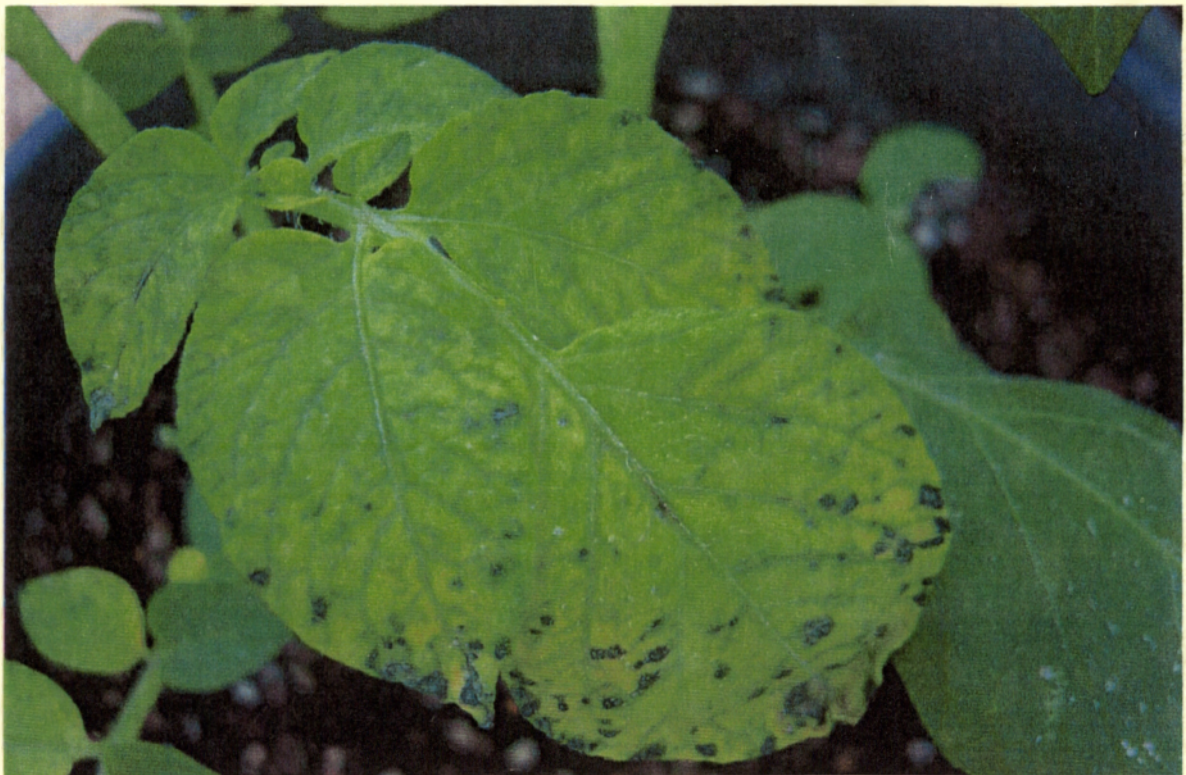


ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Θέμα: «Μελέτη της δυνατότητας απομονώσεων του ιού Y της πατάτας να προκαλέσουν συμπτώματα της νεκρωτικής δακτυλιωτής ασθένειας των κονδύλων της πατάτας».



Σπουδαστής: Κλαυδιανός Νίκος

Επιβλέπων καθηγητής: Βελισσάριος Δημήτρης

ΑΘΗΝΑ 2004

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	1
--------------------------	----------

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1) Ο ΙΟΣ Υ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ

1.1 Εισαγωγή	3
1.2 Μετάδοση	3
1.3 Συμπτώματα και ασθένειες	4
1.4 Χαρακτηριστικά και στελέχη του ιού	5
1.4.α.Απομονώσεις NTN του ιού Υ της πατάτας	6
1.5 Προσδιορισμός - Διάγνωση	7
1.6 Αντιμετώπιση	8

2) ΆΛΛΕΣ ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ

2.1 Καρούλιασμα των φύλλων (PLRV)	10
2.2 Μωσαϊκό οφειλόμενο στον ιό Α της πατάτας (PVA)	12
2.3 Απλό μωσαϊκό (PVX)	12
2.4 Τραχύ μωσαϊκό (PVX + PVY)	13
2.5 Κυματοειδές μωσαϊκό (PVX + PVA)	14
2.6 Ιός S της πατάτας	14
2.7 Ιός M της πατάτας	15

3) ΣΠΟΡΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΓΙΟΥΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΠΑΤΑΤΑΣ

3.1 Εισαγωγή	16
3.2 Παραγωγή πιστοποιημένου πατατοσπόρου	17

4) ΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ – ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Ιολογικός έλεγχος γενικά	18
4.2 Μέθοδοι IN VIVO	19
4.3 Σπουδαιότεροι μέθοδοι IN VITRO	19
4.3.1 Ορρολογικές μέθοδοι	20
4.3.2 Μεθοδολογία ενζυμικής ανοσοπροσροφήσεως (ELISA)	21
4.3.3 Άμεση ELISA	22
4.3.4 Πολυκλωνικά αντισώματα	24
4.3.5 Μονοκλωνικά αντισώματα	25
4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	27
4.4.1 Αρχή της PCR	27
4.4.2 Χαρακτηριστικά της PCR	31

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	35
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Φυτικό υλικό και στελέχη του ιού	35
2.2 Πειραματικές συνθήκες και μηχανική μόλυνση	36
2.3 Μέθοδος ELISA και έλεγχος φυτικού υλικού	38
2.4 Ανοσοδέσμευση RT-PCR (IC-RT-PCR)	44
2.5 Εκτίμηση δείκτη ασθένειας	49

3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Χαρακτηριστικά απομονώσεων	
3.1.1 Βιολογικός έλεγχος	50
3.1.2 Μοριακός έλεγχος	52
3.2 Εκδήλωση συμπτωμάτων του ιού	
3.2.1 Επί των φυτών πατάτας	53
3.2.2 Επί των κονδύλων	58
3.3 Διακύμανση Θερμοκρασίας	61
3.4 Δείκτης Ασθένειας	62
4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρακάτω μελέτη αποτελεί μέρος ερευνητικού προγράμματος που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου με σκοπό την διερεύνηση της ικανότητας απομονώσεων του ιού Υ της πατάτας να προκαλέσουν συμπτώματα της νεκρωτικής δακτυλιωτής κηλίδωσης των κονδύλων της πατάτας (PTNRD).

Η εργασία αποτελείται από δυο τμήματα. Το πρώτο μέρος είναι το θεωρητικό στο οποίο γίνεται αναφορά στον ιό Υ της πατάτας κυρίως, αλλά και σε άλλες ιολογικές ασθένειες της πατάτας. Επίσης αναλύονται οι διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται και πως γίνεται ένας ιολογικός έλεγχος. Το δεύτερο μέρος είναι το πειραματικό, όπου περιγράφεται η διαδικασία, οι μέθοδοι και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ικανότητας απομονώσεων του ιού Υ της πατάτας, να προκαλεί τα συμπτώματα της ασθένειας PTNRD σε διάφορες ποικιλίες πατάτας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στο πειραματικό μέρος είναι η μέθοδος (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), και η IC - RT - PCR.(*immunocapture reverse transcript polymerase chain reaction*). Η τελευταία είναι από τις πιο ευαίσθητες και σύγχρονες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών. Μέσω αυτής της μεθόδου ανιχνεύουμε αποκλειστικά απομονώσεις NTN του ιού Υ της πατάτας, που μέχρι τώρα θεωρούνταν οι μόνες ικανές να προκαλέσουν τα νεκρωτικά συμπτώματα της ασθένειας PTNRD σε κονδύλους πατάτας..

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ο ΙΟΣ Υ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ (POTATO VIRUS Y)

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός Υ της πατάτας (Potato virus Y, PVY) είναι ένας από τους σπουδαιότερους ιούς της πατάτας. Αυτό οφείλεται στη γρήγορη μετάδοση του ιού καθώς επίσης και στην μείωση της παραγωγής που μπορεί να προκαλέσει, από 40% - 80% αναλόγως της ευπάθειας της ποικιλίας και του στελέχους του ιού.

Μικτές μολύνσεις με τους ιούς PVA, PVX και PVS προκαλούν μεγάλες ζημιές και μερικές φορές καταστρέφουν τελείως την καλλιέργεια. Ο ιός είναι κυρίως διαδεδομένος σε όλες τις χώρες που καλλιεργούν πατάτα και εκτός αυτής προσβάλλει την τομάτα, τον καπνό και την πιπεριά.

1.2 ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Ο ιός μπορεί να μεταδοθεί με μηχανικό τρόπο (με το χυμό ή την τριβή) και με εμβολιασμό. Στην φύση ο ιός μεταδίδεται από μολυσμένο πατατόσπορο και από τουλάχιστον 73 είδη αφίδων. Ο ιός μεταφέρεται από τις αφίδες στην άκρη του στιλέτου και παραμένει εκεί ενεργός για ένα μικρό χρονικό διάστημα (συνήθως για μερικές ώρες). Ο ιός Υ της πατάτας μπορεί να βοηθήσει στη μετάδοση ενός διαφορετικού ιού (PVX). Η ένταση της συνεργιστικής αυτής δράσης εξαρτάται από το συνδυασμό των ιών και της ποικιλίας αλλά συνήθως τα συμπτώματα είναι πολύ πιο σοβαρά αφού συνδυάζονται.

1.3 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Τα συμπτώματα που εμφανίζουν τα προσβεβλημένα φυτά διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία του φυτού, το στέλεχος του ιού και κυμαίνονται από ελαφρύ μωσαϊκό μέχρι έντονες νεκρώσεις. Διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, στα πρωτογενή συμπτώματα (primary symptoms) που παρατηρούνται 3-4 εβδομάδες μετά την μόλυνση κυρίως στα νεαρά φύλλα της κορυφής και στα δευτερογενή συμπτώματα (secondary symptoms) σε φυτά που προέρχονται από μολυσμένους κονδύλους.

Συμπτώματα πρωτογενούς μόλυνσης: Αφορούν στην εμφάνιση νεκρωτικών ραβδώσεων κατά μήκος των νευρώσεων της κάτω επιφάνειας των φύλλων. Στη συνέχεια τα φύλλα κυρίως της βάσης του φυτού νεκρώνονται ή πέφτουν ή παραμένουν κρεμασμένα ξηρά πάνω στο φυτό. Τα φύλλα της κορυφής παραμένουν μικρά, ελαφρώς χλωρωτικά και σχηματίζουν ροζέτα. Τα φυτά αυτά τελικά παραμένουν καχεκτικά. Σε άλλες ποικιλίες που καλλιεργούνται στη Βόρεια Ευρώπη τα συμπτώματα διαφέρουν και εμφανίζονται ως ελαφρύ μωσαϊκό των φύλλων ή ως μικροφυλλία με σκληρά, χλωρωτικά και τραχείας επιφάνειας φύλλα.

Συμπτώματα δευτερογενούς μόλυνσης: Εμφανίζουν φυτά που προέρχονται από μολυσμένο σπόρο, αφορούν νανισμό, μικροφυλλία, κιτρινοπράσινο μωσαϊκό και τραχύτητα του ελάσματος των φύλλων. Σε χαμηλές θερμοκρασίες (10⁰C) και υψηλές θερμοκρασίες (25⁰C) έχουμε απόκρυψη των συμπτωμάτων αλλά η ασθένεια αναγνωρίζεται από την τραχύτητα που εμφανίζεται στα φύλλα. Τα φύλλα είναι εύθριπτα και σχηματίζουν ρόδακα στην κορυφή του βλαστού. Τα φυτά παραμένουν καχεκτικά και παράγουν μικρότερους κονδύλους οι οποίοι όταν φυτευτούν δίνουν φυτά με τα ίδια συμπτώματα.

Το στέλεχος PVY^N προκαλεί ασαφή ποικιλοχλώρωση τόσο την πρώτη όσο και την δεύτερη χρονιά. Γενικά υπάρχει μια σχέση ανάμεσα στα συμπτώματα που εμφανίζονται στα φύλλα και σε αυτά που εμφανίζονται στους κονδύλους. Ποικιλίες που αντιδρούν με νέκρωση στη φυλή PVY^O, μερικές φορές εμφανίζουν καστανά δακτυλίδια στο φλοιό των κονδύλων. Επίσης η φυλή PVY^C προκαλεί σε ορισμένες ποικιλίες εσωτερική και εξωτερική νέκρωση των κονδύλων.

Λόγω της ποικιλομορφίας των συμπτωμάτων η διάγνωση της ασθένειας αυτής θα πρέπει να βασίζεται σε εργαστηριακές δοκιμές πάνω σε φυτά δείκτες με ανοσολογικές ή μοριακές μεθόδους.

Ο ιός Y προσβάλλει πολλά ζιζάνια καθώς και καλλιεργούμενα φυτά όπως την πιπεριά, την τομάτα, τον καπνό, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν πηγές διατήρησης και μετάδοσης του ιού.

1.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

Ο ιός Y της πατάτας (PVY) είναι μέλος του γένους *Potyvirus*, της οικογένειας *Potyviridae*. Έχει μήκος 730 nm και πάχος 11nm. Σε χυμό καπνού το σημείο θερμικής αδρανοποίησης είναι μεταξύ 50^oC και 62^oC, η οριακή αραιώση 10⁻² – 10⁻⁶ και η διάρκεια ζωής in vitro είναι 7 – 50 ημέρες.

Έχουν χαρακτηριστεί τρεις ομάδες στελεχών του ιού ανάλογα με τα συμπτώματα που προκαλούν σε ορισμένα φυτά δείκτες, όπως είναι το *Nicotiana tabacum*. Οι ομάδες στελεχών είναι *Potato virus Y^O* (PVY^O), *Potato virus Y^N* (PVY^N) και *Potato virus Y^C* (PVY^C). Από τις τρεις παραπάνω ομάδες η PVY^N είναι η πιο επικίνδυνη γιατί στις περισσότερες ποικιλίες η επέκταση της είναι πιο γρήγορη και προκαλεί εντονότερες νεκρώσεις. Το στέλεχος PVY^O προκαλεί ήπιο ή έντονο μωσαϊκό και αλλού τοπική και διασυστηματική νέκρωση. Το στέλεχος PVY^C φαίνεται σήμερα είναι αρκετά περιορισμένο γιατί οι περισσότερες ποικιλίες εμφανίζουν

ανθεκτικότητα αγρού καθώς επίσης και στο γεγονός ότι τα περισσότερα μέλη του στελέχους δεν μεταδίδονται με αφίδες.

Τα στελέχη μπορούν να διαφοροποιηθούν ορολογικά με εξειδικευμένα μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν παρασκευασθεί σε διάφορα εργαστήρια. Σε μοριακό επίπεδο, διάφορες προσεγγίσεις έχουν γίνει για τον προσδιορισμό των σχέσεων των στελεχών του PVY μεταξύ τους: σύγκριση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης και της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής (NTR) καθώς και της P1 πρωτεΐνης and 5' NTR· χαρτογράφηση με ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP) του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης, της P1 πρωτεΐνης and 5' NTR, όπως και ολοκλήρου του γονιδιώματος.

Μια υποομάδα του PVY^N στελέχους που τα τελευταία χρόνια απασχολεί έντονα διεθνώς τους πατατοκαλλιεργητές είναι οι ισχυρές παθογόνες απομονώσεις NTN του ιού Y.

1.4.α. ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ NTN ΤΟΥ ΙΟΥ Y ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ

Οι απομονώσεις PVY^{NTN} προκαλούν την ασθένεια της δακτυλιωτής κηλίδωσης των κονδύλων της πατάτας ή PTNRD (Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease). Η ασθένεια προκαλεί μεγάλα νεκρωτικά δαχτυλίδια στους κονδύλους της πατάτας. Ακριβής ανίχνευση των συγκεκριμένων αυτών απομονώσεων επιτεύχθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) που αποτελεί και την μοναδική μέθοδο που επιτυγχάνει τη διάκριση των απομονώσεων NTN από τις υπόλοιπες της ομάδας στελεχών N του ιού, όπου ανήκει και η ίδια. Ο διαχωρισμός των απομονώσεων PVY^{NTN} από αυτές του PVY^N με την βοήθεια μοριακών τεχνικών δεν είναι πάντα εύκολος εξαιτίας της μεγάλης ποικιλομορφίας που έχει αυτή η υποομάδα. Το χαρακτηριστικό προϊόν της PCR είναι αυτό

των 835 ζευγών βάσεων. Η ασθένεια εμφανίστηκε τις αρχές τις δεκαετίας του '80 στην Ουγγαρία και έχει εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο. Πρωτοεμφανίστηκε στην Ελλάδα το 1994 σε μολυσμένους πατατόσπορους προερχόμενους από την Ολλανδία. Σε όλους τους κονδύλους οι οποίοι ελέγχθηκαν με την ορρολογική μέθοδο DAS-ELISA ανιχνεύθηκε ο ιός Y της πατάτας. Τα μέτρα που πάρθηκαν τότε δεν επέτρεψαν την περαιτέρω διαδοσή της. Το 1998 όμως, η ασθένεια έκανε πάλι την εμφάνιση της με πιο επιδημική μορφή κυρίως σε φυτείες της ποικιλίας Hermes από εισαχθέντα πατατόσπορο Σκοτίας και δυστυχώς από τότε απομονώθηκε και σε πολλές άλλες περιοχές της χώρας. .

Όλα τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι πρόκειται για μία επικίνδυνη φυλή που χαρακτηρίζεται από έντονο επιδημικό χαρακτήρα.

1.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ – ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Προσπάθειες γίνονται διεθνώς από πολλά εργαστήρια για την παραγωγή απαλλαγμένων από ιούς φυτικών υλικών, ένας στόχος ο οποίος για να επιτευχθεί απαιτεί την διαθεσιμότητα ακριβών και γρήγορων μεθόδων για την ανίχνευση σε πολύ μικρά επίπεδα, ισωμάτων και ιικών RNA μορίων. Για αυτό το λόγο ,εντατική έρευνα έχει ξεκινήσει για την ανίχνευση του PVY και τη διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών. Η ορρολογική μέθοδος ELISA παραμένει η μέθοδος επιλογής για μια ανίχνευση ρουτίνας. Παρόλα αυτά, η ευαισθησία της δεν ανιχνεύει μόλυνση σε κονδύλους σε λήθαργο ή στις αφίδες και η γενική ακτίνα ανίχνευσης δεν διαχωρίζει απομονώσεις όπως αυτά του PVY^{NTN}.

Για τους παραπάνω λόγους, μια σειρά από μοριακές μεθόδους αναπτύχθηκαν όπως ο μοριακός υβριδισμός, η αλυσιδωτή αντίδραση της

πολυμεράσης (PCR),σε διάφορα πρωτόκολλα, IC – PCR (Immuncapture polymerase chain reaction), PCR – ELISA (PCR – microplate hybridization), και πιο πρόσφατα η RealTime PCR και η ισοθερμική NASBA. Η ανάπτυξη τόσο ευαίσθητων τεχνικών κάνει δυνατή την ανίχνευση ιών ,όπως του PVY, εκεί όπου βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

1.6 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Για την αντιμετώπιση του PVY και γενικότερα των ιώσεων στη γεωργική πράξη δεν υπάρχουν γνωστά θεραπευτικά μέτρα. Προληπτικά προτείνεται εφαρμογή των παρακάτω μέτρων:

Χρησιμοποίηση πιστοποιημένου πατατόσπορου.

Πιστοποιημένος πατατόσπορος, ο οποίος χρησιμοποιείται για παραγωγή πατάτας προς κατανάλωση, θεωρείται εκείνος στον οποίο ο αριθμός των μολυσμένων κονδύλων από τους ιούς δεν υπερβαίνει σε ποσοστό το 10% των κονδύλων αθροιστικά για τους σημαντικούς ιούς. Πλήρως απαλλαγμένος από ιώσεις πατατόσπορος δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή πατάτας προς κατανάλωση καθόσον τέτοιος πατατόσπορος έχει υπερβολικά υψηλή τιμή, ασύμφορη για τον παραπάνω σκοπό και επίσης βρίσκεται στο στάδιο των μικροκονδύλων οι οποίοι είναι κατάλληλοι μόνο για παραγωγή πατατόσπορου.

Αποφυγή τεμαχισμού και ιδίως πολυτεμαχισμού του πατατόσπορου διότι με αυτό τον τρόπο αυξάνεται το αρχικό ποσοστό μολυσμένων κονδύλων οι οποίοι με τη σειρά τους θα δώσουν μεγαλύτερο αριθμό

πηγών μόλυνσης μέσα στο χωράφι.

Απομάκρυνση και καταστροφή των ζιζανίων και των εθελοντών φυτών πατάτας που προέρχονται από προηγούμενη καλλιέργεια καθόσον αποτελούν σοβαρές πηγές μόλυνσης.

Ανθεκτικές ποικιλίες. Αυτές λαμβάνονται είτε με μεθόδους κλασικής γενετικής (διασταυρώσεις) είτε με τις σύγχρονες μεθόδους γενετικής μηχανικής. Στην περίπτωση παραγωγής πατατόσπορου, συνιστάται απαραίτητα η καταστροφή (κάψιμο) του φυλλώματος μόλις η φυτεία φθάσει στην ωριμότητα και τα φυτά αρχίζουν να καταρρέουν (σπάσιμο φυτείας) ώστε να εμποδιστεί η κάθοδος των ιών από το φύλλωμα προς τους κονδύλους με το καθοδικό ρεύμα των φυτικών χυμών.

2. ΑΛΛΕΣ ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ

2.1 Καρούλιασμα των φύλλων της πατάτας (PLRV)

Η ασθένεια αυτή προκαλείται από τον ιό του καρούλιασματος των φύλλων της πατάτας (Potato leafroll virus, PLRV) ο οποίος μεταδίδεται με τους μολυσμένους κονδύλους και με τις αφίδες. Δεν μεταδίδεται όμως μηχανικά όπως όλοι οι άλλοι ιοί που προσβάλλουν την πατάτα. Έχει μεγάλη οικονομική σημασία καθόσον ο ιός αυτός μαζί με τον ιό Υ της πατάτας θεωρούνται οι κύριοι υπεύθυνοι για τον εκφυλισμό της πατάτας ο οποίος παρατηρείται όταν δεν χρησιμοποιείται για σπορά πιστοποιημένος πατατόσπορος. Η προσβολή στο χωράφι κυμαίνεται από 10% - 80% ανάλογα με την ευαισθησία της ποικιλίας, την ποιότητα του πατατόσπορου που φυτεύτηκε και τις καιρικές συνθήκες που επηρεάζουν τους πληθυσμούς και τις πτήσεις των αφίδων. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται προσβεβλημένα φυτά ποικίλλουν ανάλογα με την ποικιλία του φυτού, τη φυλή του ιού και τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν. Γενικά, μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, συμπτώματα πρωτογενούς και δευτερογενούς μόλυνσης.

- **Συμπτώματα πρωτογενούς μόλυνσης:** εμφανίζουν φυτά που μολύνθηκαν στο χωράφι κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Τα συμπτώματα αυτά παρατηρούνται κυρίως στα νεαρά φύλλα της κορυφής, 3 - 4 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με αφίδες και αφορούν ελαφρό καρούλιασμα, χλώρωση, ερυθρίαση και ανορθωμένη εμφάνιση των φύλλων της κορυφής. Όταν η μόλυνση γίνει σε νεαρό στάδιο του φυτού, τότε προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου παρατηρείται επίσης ένα καρούλιασμα των φύλλων της βάσης του φυτού που είναι αρκετά

χαρακτηριστικό για την ίωση αυτή.

- **Συμπτώματα δευτερογενούς μόλυνσης:** εμφανίζουν φυτά που προέρχονται από μολυσμένους κονδύλους προηγούμενης καλλιέργειας. Τα συμπτώματα αυτά είναι σοβαρότερα και αφορούν έντονο νανισμό του φυτού, σκληρά εύθρυπτα και καρουλιασμένα φύλλα κυρίως στη βάση του φυτού και χλώρωση των φύλλων της κορυφής. Γενικά, το φυτό παρουσιάζει ανορθωμένη εμφάνιση. Τα καρουλιασμένα φύλλα της βάσης όταν αναταραχθούν παράγουν ένα χαρακτηριστικό μεταλλικό ήχο λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης αμύλου σ' αυτά. Αργότερα παρουσιάζουν μια περιφερειακή ξήρανση του ελάσματος που μοιάζει με την τροφοπενία καλίου. Μολυσμένος σπόρος ευαίσθητων ποικιλιών συνήθως αργεί να βλαστήσει και δίνει νηματωμένα φύτερα. Μολυσμένοι κόνδυλοι ορισμένων ποικιλιών πατάτας εμφανίζουν στο εσωτερικό τους μια νέκρωση υπό μορφή δικτύου (δικτυωτή νέκρωση). Η μείωση της παραγωγής είναι σοβαρότερη σε φυτά που εμφανίζουν συμπτώματα δευτερογενούς μόλυνσης παρά σε εκείνα που εμφανίζουν πρωτογενή συμπτώματα. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω συμπτώματα δεν είναι παθογνωμικά καθόσον παρόμοια συμπτώματα μπορούν να παρατηρηθούν και σε φυτά προσβεβλημένα από ριζοκτόνια ή με ζημιές στο ριζικό τους σύστημα. Για τους λόγους αυτούς η διάγνωση της ασθένειας θα πρέπει να βασίζεται σε εργαστηριακές δοκιμές εφαρμόζοντας ανοσολογικές ή άλλες μεθόδους. Πλην της πατάτας, ο ιός αυτός προσβάλλει μικρό αριθμό ζιζανίων που ανήκουν στα Σολανώδη και αποτελούν πηγές διατήρησης του ιού και μόλυνσης των νέων καλλιεργειών.

2.2 Μωσαϊκό οφειλόμενο στον ιό A της πατάτας (PVA)

Η ασθένεια αυτή που προκαλείται από τον ιό A της πατάτας (Potato virus A, PVA) μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της παραγωγής κατά 15%. Μεταδίδεται με το μολυσμένο πατατόσπορο και με τις αφίδες. Τα προκαλούμενα από τον ιό A συμπτώματα στο χωράφι μοιάζουν πολύ με εκείνα του PVX αν και ποικίλουν ανάλογα με την ποικιλία της πατάτας και τη φυλή του ιού. Ανθεκτικές ποικιλίες δεν εμφανίζουν συμπτώματα ενώ υπερευαίσθητες ποικιλίες παρουσιάζουν νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα της κορυφής ή και νέκρωση της κορυφής του φυτού. Πολλές υπερευαίσθητες ποικιλίες θεωρούνται ανθεκτικές στην προσβολή από τον ιό στο χωράφι. Τα συμπτώματα που εμφανίζουν οι υπόλοιπες ποικιλίες είναι ελαφρό μέχρι έντονο μωσαϊκό, διαφάνεια των νευρώσεων, κυματισμός και κατσάρωμα της περιφέρειας του ελάσματος. Τα συμπτώματα αυτά είναι δύσκολα ορατά σε θερμές ημέρες με μεγάλη ηλιοφάνεια. Ο ιός A της πατάτας έχει 3 - 4 φυλές με διαφορετική μολυσματικότητα. Ο κύκλος ξενιστών είναι πολύ περιορισμένος, ώστε ως μόνες πηγές μόλυνσης στο χωράφι να θεωρούνται οι κόνδυλοι που παρέμειναν στο χωράφι από την προηγούμενη καλλιέργεια και δίνουν φυτά εθελοντές. Η διάγνωση επιτυγχάνεται μόνο με εργαστηριακές δοκιμές κυρίως ELISA καθόσον τα συμπτώματα μοιάζουν με εκείνα του PVX.

2.3 Απλό μωσαϊκό (PVX)

Η ασθένεια αυτή προκαλείται από τον ιό X της πατάτας (Potato virus X, PVX) ο οποίος μεταδίδεται με το μολυσμένο σπόρο και μηχανικά με το χυμό μολυσμένων φυτών. Δεν μεταδίδεται με αφίδες. Μολονότι ο ιός X μόνος του προκαλεί πολύ ελαφρά συμπτώματα και η μείωση της

παραγωγής των μολυσμένων φυτών δεν ξεπερνά το 10% σε μικτές μολύνσεις με τους ιούς PVA και PVY ο ιός αυτός προκαλεί σημαντικές ζημιές λόγω της σοβαρότητας των συμπτωμάτων. Επομένως ο ιός X αποτελεί πάντοτε ένα πιθανό σοβαρό παθογόνο της πατάτας. Ο ιός είναι ευρέως διαδεδομένος σε όλες τις περιοχές όπου καλλιεργείται η πατάτα. Αυτό οφείλεται στα ήπια συμπτώματα που εμφανίζουν τα προσβεβλημένα φυτά και δεν γίνονται εύκολα αντιληπτά στο αγρό, αλλά και στον τρόπο μετάδοσης του με τον μολυσμένο φυτικό χυμό κυρίως στις περιοχές όπου εφαρμόζεται ο τεμαχισμός του πατατόσπορου. Τα συμπτώματα που εμφανίζουν τα προσβεβλημένα φυτά είναι ένα ήπιο μωσαϊκό των φύλλων το οποίο στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν γίνεται αντιληπτό παρά μόνο στα κατώτερα σκιαζόμενα φύλλα. Ανάλογα με την ποικιλία της πατάτας ή τη φυλή του ιού μπορεί να παρατηρηθεί ένα μεσονεύριο μωσαϊκό ή μια τραχύτητα και κατσάρωμα του ελάσματος των φύλλων. Εκτός των παραπάνω ελαφρών συμπτωμάτων τα προσβεβλημένα φυτά αναπτύσσονται κανονικά και γι' αυτό είναι δύσκολη η επισημάνσή τους στο χωράφι. Ο ιός X της πατάτας έχει αρκετές φυλές οι οποίες ταξινομούνται σε 4 ορρότυπους (X_1 , X_2 , X_3 , X_4). Οι 3 πρώτοι ορρότυποι προκαλούν νεκρωτικές κηλίδες σε ποικιλίες πατάτας με υπερευαισθησία γεγονός που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στον ιό αυτό στον αγρό. Ο ιός X της πατάτας έχει ευρύ κύκλο ξενιστών κυρίως μεταξύ σολανωδών ζιζανίων τα οποία και αποτελούν πηγές μόλυνσης των καλλιεργειών. Η διάγνωση επιτυγχάνεται με εργαστηριακές δοκιμές πάνω σε φυτά - δείκτες με ανοσολογικές ή μοριακές μεθόδους.

2.4 Τραχύ μωσαϊκό (PVX + PVY)

Η ασθένεια αυτή οφείλεται στη μικτή μόλυνση των φυτών με τους ιούς PVY και PVX. Η περίπτωση αυτή παρουσιάζεται σε φυτά που προέρχονται

από μολυσμένους με τον PVX κόνδυλους και τα οποία μολύνονται κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου στο χωράφι με τον PVY μέσω αφίδων. Τα μολυσμένα φυτά παραμένουν νάνα και εμφανίζουν νεκρώσεις των νευρώσεων στα κατώτερα φύλλα όπως στην περίπτωση των δευτερογενών συμπτωμάτων που προκαλεί ο PVY, ενώ στα φύλλα της κορυφής εμφανίζεται έντονο μωσαϊκό ως και κατσάρωμα και τραχύτητα του ελάσματος. Τα φύλλα της κορυφής παρουσιάζουν έντονο τρίχωμα και σχηματίζουν ροζέτα. Οι κόνδυλοι των φυτών αυτών παραμένουν μικροί. Φυτά προερχόμενα από μολυσμένο πατατόσπορο, ή που μολύνθηκαν σε νεαρό στάδιο στο χωράφι, έχουν έντονο νανισμό και τελικά ξηραίνονται. Οι ζημιές από την ασθένεια αυτή μπορούν να φθάσουν και το 80% της παραγωγής.

2.5 Κυματοειδές μωσαϊκό (PVX + PVA)

Η ασθένεια αυτή οφείλεται στη μικτή μόλυνση των φυτών από τους ιούς PVX και PVA. Εμφανίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα από ότι το τραχύ μωσαϊκό. Τα μολυσμένα φυτά εμφανίζουν ελαφρό μωσαϊκό και κυματισμό της περιφέρειας του ελάσματος. Στις περισσότερες των περιπτώσεων είναι δύσκολη έως αδύνατη η διάκριση της ασθένειας αυτής από το τραχύ μωσαϊκό. Τα μολυσμένα φυτά παραμένουν νάνα και οι παραγόμενοι κόνδυλοι είναι μικροί.

2.6 Ιός S της πατάτας

Η ασθένεια αυτή που προκαλείται από τον ιό S της πατάτας είναι διαδεδομένη σε όλες τις χώρες που καλλιεργείται πατάτα. Δεν υπάρχουν λεπτομερή στοιχεία για τις ζημιές που προκαλεί αλλά έχουν αναφερθεί ότι

φθάνουν και το 10% - 20% της παραγωγής. Μεταδίδεται με μολυσμένο σπόρο και μηχανικά με το χυμό μολυσμένων φυτών. Ο ιός S συνήθως δεν προκαλεί συμπτώματα στις περισσότερες ποικιλίες και όταν εμφανισθούν είναι ελαφρά. Παρουσιάζει βάθυνση των νεύρων, τραχύτητα του ελάσματος των φύλλων και πιθανώς νανισμό. Μερικές φορές προκαλεί ποικιλόχρωση ή απόχρωση ορείχαλκου στο έλασμα των φύλλων. Επίσης εμφανίζονται νεκρωτικές κηλίδες στην επάνω επιφάνεια των φύλλων. Στην πατάτα ο ιός πολύ συχνά βρίσκεται σε μικτές μολύνσεις με τον ιό M. Για τη διάγνωση του ιού εκτός από εργαστηριακές δοκιμές χρησιμοποιούνται και φυτά – δείκτες.

2.7 Ο Ιός M της πατάτας

Η ασθένεια αυτή προκαλείται από τον ιό M της πατάτας (Potato virus M, PVM). Είναι διαδεδομένη σ' όλες τις χώρες που καλλιεργείται η πατάτα αλλά είναι πιο σπουδαία στην Ανατολική Ευρώπη. Τα συμπτώματα που προκαλεί ο ιός M στα φύλλα της πατάτας ποικίλουν από πολύ ήπια μέχρι έντονα όπως ποικιλοχρώσεις, μωσαϊκό κατσάρωμα και καρούλιασμα των φύλλων της κορυφή. Τα φύλλα μπορεί να εμφανισθούν επίσης παραμορφωμένο. Τα μολυσμένα φυτά είναι συνήθως νάνα. Σε ορισμένες ποικιλίες ο ιός προκαλεί νέκρωση των στελεχών και των μίσχων. Η ένταση των συμπτωμάτων επηρεάζεται από το στέλεχος του ιού, την ποικιλία και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Ο ιός πολλαπλασιάζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες γύρω στους 19°C ενώ σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 24°C έχουμε απόκρυψη των συμπτωμάτων.

3. ΣΠΟΡΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΓΙΟΥΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΠΑΤΑΤΑΣ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πατάτα πολλαπλασιάζεται με πατατόσπορο, όχι δηλαδή με τον σπόρο που παράγουν τα άνθη της αλλά με τους κονδύλους που παράγουν τα ριζώματά της. Οι κόνδυλοι αυτοί προέρχονται από προηγούμενη παραγωγή και έχουν μείνει επί ένα χρονικό διάστημα σε κατάσταση ληθάργου (είτε στο έδαφος, είτε στην αποθήκη). Ο αγενής πολλαπλασιασμός της πατάτας δημιουργεί πολλά προβλήματα στην παραγωγή υγιούς και υψηλής ποιότητας πατατόσπορου. Οι διάφορες προσβολές και κυρίως οι ιολογικές προκαλούν υποβάθμιση της υγειονομικής του κατάστασης και έχουν σαν συνέπεια τη μείωση των αποδόσεων που πολλές φορές φτάνει σε πολύ υψηλά ποσοστά. Υπάρχουν ιστορικές μαρτυρίες ότι οι ιολογικές ασθένειες άρχισαν να προσβάλλουν την πατάτα αμέσως μετά την εισαγωγή της στην Ευρώπη. Σταδιακά η εμφάνιση των ιολογικών ασθενειών αυξανόταν καθώς κόνδυλοι από μολυσμένες καλλιέργειες χρησιμοποιούνταν ως σπόρος για την επόμενη καλλιέργεια. Το φαινόμενο αυτό το ονόμαζαν "εκφυλισμό της πατάτας" και το απέδιδαν είτε στην εξάντληση ή την χειροτέρευση της καλλιέργειας από τον συνεχή αγενή πολλαπλασιασμό είτε στις κακές εδαφικές ή κλιματικές συνθήκες. Ακόμη και τότε όμως οι καλλιεργητές αναγνώριζαν ότι ορισμένες περιοχές έδιναν καλύτερο σπόρο από άλλες. Συμπερασματικά πιστεύεται ότι στις περιοχές αυτές ο πληθυσμός των φορέων των ιών ήταν ιδιαίτερα μικρός. Όταν έγινε αντιληπτό ότι η υποβάθμιση της ποιότητας του σπόρου οφειλόταν σε παθογόνα καθιερώθηκε η καλλιέργεια της πατάτας που προορίζεται για σπόρο σε ξεχωριστές περιοχές από αυτή που προορίζεται για κατανάλωση. Από τότε

η παραγωγή πατατόσπορου αναπτύχθηκε πολύ και σε ορισμένες χώρες αποτελεί πολύ κερδοφόρα βιομηχανία. Στις αναπτυγμένες χώρες, το ποσοστό του πιστοποιημένου πατατόσπορου που χρησιμοποιείται είναι πολύ μεγάλο και φθάνει στον Καναδά το 91%, στην Ολλανδία το 94% και στη Μεγάλη Βρετανία το 66% . Οι χώρες αυτές έχουν αντίστοιχα και τις υψηλότερες στρεμματικές αποδόσεις Αντίθετα στις αναπτυσσόμενες χώρες η μικρή στρεμματική απόδοση οφείλεται στην κακή φυτουγειονομική κατάσταση του χρησιμοποιούμενου σπόρου, γιατί οι χώρες αυτές δεν διαθέτουν κατάλληλα συστήματα παραγωγής του, ή οι περιβαντολογικές συνθήκες δεν ευνοούν την ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων. Έτσι αναγκάζονται να προμηθεύονται πιστοποιημένο σπόρο από το εξωτερικό σε υψηλές τιμές που πολλές φορές κάνει την πατατοκαλλιέργεια ασύμφορη. Στις χώρες αυτές το ποσοστό χρήσης πιστοποιημένου πατατόσπορου είναι πολύ μικρό.

3.2 Παραγωγή πιστοποιημένου πατατόσπορου

Στις καλλιέργειες που προορίζονται για παραγωγή πιστοποιημένου πατατόσπορου γίνονται δύο τουλάχιστον καλλιεργητικοί έλεγχοι, από τους οποίους ο πρώτος γίνεται σ'ένα μήνα από το φύτεμα. Κατά τη διάρκεια των ελέγχων ή και ενδιάμεσα γίνεται επίσημη δειγματοληψία φύλλων στις σποροκαλλιέργειες (όταν χρειάζεται κατά την κρίση της αρμόδιας υπηρεσίας ελέγχου και πιστοποίησης) για ιολογικό εργαστηριακό έλεγχο. Μετά την αποφύλλωση ή τη συγκομιδή ή στη διάρκεια της συγκομιδής γίνεται επίσημη δειγματοληψία κονδύλων για ιολογικό έλεγχο και στις περιπτώσεις εκείνες που προσδιορίζονται από την αρμόδια υπηρεσία ελέγχου και πιστοποίησης. Εφόσον τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά, η υπηρεσία εκδίδει για κάθε σπορομερίδα δελτίο καλλιεργητικού ελέγχου, που συνοδεύει τον ατυποποίητο πατατόσπορο

μέχρι την αρχή της επεξεργασίας του. Τέλος, οι σπορομερίδες για τις οποίες έχει εκδοθεί το αυτό δελτίο ελέγχονται κατά τη συσκευασία και σφράγισή τους από την αρμόδια υπηρεσία ελέγχου και πιστοποίησης, προκειμένου να διαπιστωθεί αν πληρούν ή όχι τις οριζόμενες προδιαγραφές. Εάν τις πληρούν, τότε γίνεται συσκευασία του πιστοποιημένου πατατόσπορου σε σακιά γιούτινα, τα οποία φέρουν επίσημη ετικέτα της αρμόδιας υπηρεσίας ελέγχου και πιστοποίησης, χρώματος μπλε, με τις ακόλουθες ενδείξεις:

- τη χώρα προέλευσης μαζί με το σύμβολο Ε,
- το είδος
- την ποικιλία,
- την κατηγορία,
- τον αριθμό σπορομερίδας,
- την ημερομηνία που σφραγίστηκε το σακί και
- το δηλωμένο καθαρό βάρος

Επιπλέον γίνεται και μετέλεγχος από το Ινστιτούτο Ελέγχου Ποικιλιών, για τον έλεγχο της ποικιλίας και της ποικιλιακής καθαρότητας κάθε σπορομερίδας.

4. ΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ – ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Ιολογικός έλεγχος γενικά

Ιολογικός έλεγχος ενός φυτού είναι ο έλεγχος της μόλυνσής του από ιό ή ιοειδές δηλαδή η ανίχνευση συγκεκριμένης ή οποιασδήποτε ιολογικής μόλυνσής.

Διάγνωση είναι η εύρεση του παθογόνου αιτίου μιας ασθένειας.

Ανίχνευση ενός μολυσματικού παθογόνου ονομάζεται η ανίχνευση της

παρουσίας ενός συγκεκριμένου μολυσματικού παθογόνου στο φυτό. **Ταυτοποίηση** ενός οργανισμού ονομάζεται η εύρεση της ταυτότητός του. Οι ιολογικές ασθένειες έχουν απαιτητικές διαγνωστικές μεθόδους. Οι μέθοδοι αυτές, ανήκουν σε δυο ομάδες τις *in vivo* και τις *in vitro*.

4.2 Μέθοδοι IN VIVO

Οι μέθοδοι *in vivo* αφορούν στη μόλυνση φυτών-δεικτών. Η μόλυνση συνήθως γίνεται με εμβολιασμό, μηχανικά (με το χυμό ή με την τριβή) και με φορείς (έντομα, νηματώδεις, μύκητες). Τα φυτά-δείκτες διατηρούνται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους υπό συνθήκες αποφυγής των τυχαίων μολύνσεων και καλής αναπτύξεως. Στις περισσότερες περιπτώσεις διατηρούνται εντός θερμοκηπίου, κλιματιζόμενου θαλάμου ή εντομοστεγούς κλωβού, ενώ σε λίγες περιπτώσεις (π.χ. σε μερικές ιώσεις μηλοειδών και πυρηνοκάρπων) είναι δυνατόν να διατηρούνται σε ειδικούς αγρούς στο ύπαιθρο. Οι αντιδράσεις των φυτών-δεικτών (συμπτώματα) αποδεικνύουν ότι το φυτό από το οποίο προήλθε το μόλυσμα φέρει πράγματι μόλυνση από ιό. Ο τύπος των αντιδράσεων είναι δυνατό να είναι εξειδικευμένος σε βαθμό ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση ενός συγκεκριμένου ιού.

4.3 Σπουδαιότεροι μέθοδοι IN VITRO

Οι μέθοδοι αυτές αφορούν στην καθαρά εργαστηριακή ανίχνευση συγκεκριμένων ιών. Κυρίως αφορούν στην παρατήρηση των σωματιδίων και στην ανίχνευση των νουκλεϊνικών οξέων και των πρωτεϊνών των παθογόνων αυτών. Έτσι οι μέθοδοι αυτές αναλύονται παρακάτω. Πλεονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι: η ταχύτητα (σε ώρες) και η μαζικότητα (μεγάλος αριθμός συγχρόνων εξετάσεων) των αποτελεσμάτων. Μειονεκτήματα είναι οι απαιτήσεις σε ειδικά εργαστηριακά όργανα και

εξειδικευμένο προσωπικό. Επίσης από τις μεθόδους αυτές, εκείνες που ανιχνεύουν πρωτεΐνες (ορρολογικές, ηλεκτροφόρηση) και νουκλεοξέα (ηλεκτροφόρηση, υβριδισμός νουκλεοξέων, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) δεν μπορούν να εφαρμοσθούν εάν δεν έχει προηγουμένως απομονωθεί και γίνει γνωστό το παθογόνο.

4.3.1 Ορολογικές μέθοδοι

Η σχετική μεθοδολογία ονομάζεται ορρολογική μεθοδολογία (λόγω της χρήσεως αντι-ορρού) ή ανοσολογική μεθοδολογία (επειδή βασίζεται στο ανοσολογικό σύστημα των ζώων για την παραγωγή αντιδραστηρίων, δηλαδή αντισωμάτων). Οι διάφορες ορρολογικές (ανοσολογικές) μέθοδοι διαφοροποιούνται μεταξύ τους από τον τρόπο που φέρονται σε επαφή το αντιγόνο (π.χ. ιός) με το αντίσωμα και γίνεται ορατή η αντίδραση αυτής της ενώσεως. Οι σπουδαιότερες ορρολογικές μέθοδοι είναι:

1) Οι πρώτες ορρολογικές μέθοδοι βασίζονταν στην ορατή αντίδραση γαλακτοχρόου κατακρημνίσεως που προκύπτει όταν έρχονται σε επαφή μόρια αντιγόνου με μόρια του ομολόγου αντισώματος, όταν αυτό γίνεται ύστερα από ανάμιξη αιωρημάτων των δύο αυτών αντιδραστηρίων (σε υγρή φάση). Οι μέθοδοι αυτές ήσαν κυρίως δύο, ή μία σε υγρή και η δεύτερη σε στερεή φάση: α) Η μέθοδος της μικροκατακρημνίσεως (microprecipitation) η οποία υπήρξε η πρώτη και η μόνη κατά την 10-ετία του 1950. Είναι μέθοδος μεγάλης ακριβείας και σχετικά μεγάλης ευαισθησίας, αλλά δύσχρηστη. Μετά την 10-ετία του 1960 χρησιμοποιείται μόνο για την τιτλοποίηση του αντιορρού. β) Ακολούθησε η μέθοδος της διπλής διαχύσεως σε πήγμα άγαρ (double diffusion ή Ouchterlony gel diffusion). Αυτή περιλαμβάνει τη χρήση πηκμάτος αγαρόζης διαμέσου του οποίου διαχέονται, από αντίθετες κατευθύνσεις, το αντιγόνο και το αντίσωμα σχηματίζοντας γραμμές καθιζήσεως, όταν συναντηθούν σε άριστες

συγκεντρώσεις. Αυτές οι δοκιμές επιτρέπουν τον διαχωρισμό διαφόρων αντιγόνων και αντισωμάτων από το μέγεθος τους, τον συντελεστή διαχύσεως και τις συγκεντρώσεις τους. Έτσι, είναι αρκετά χρήσιμες για την ταυτοποίηση ιών σε χυμό μολυσμένων φυτών, σε μερικώς καθαρό ή σε καθαρό παρασκεύασμα του ιού. Η δοκιμή αυτή που χρησιμοποιείται ευρέως στην ταυτοποίηση ιών και τον διαχωρισμό στελεχών ενός ιού, αποτελούσε την μέθοδο μαζικών διαγνώσεων από την 10-ετία του 1960 μέχρι την εφεύρεση της πολύ καλλίτερης της μεθόδου ELISA κατά τα τέλη της 10-ετίας του 1970.

4.3.2 Μεθοδολογία ενζυμικής ανοσοπροσροφήσεως (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (ELISA)

Από τα μέσα περίπου της 10 ετίας του 1970, ο Voller εισήγαγε για πρώτη φορά την ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσροφήσεως (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), η οποία στη συνέχεια εφαρμόστηκε για την ανίχνευση μεγάλου αριθμού αντιγόνων.

Αρχικά η ELISA χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την ταυτοποίηση σοβαρών παθογόνων του ανθρώπου και των ζώων. Από το 1977 άρχισαν οι εφαρμογές της στην φυτοπαθολογία, (Clark και Adams, 1977) αρχικά για τη διάγνωση ιών, αργότερα και για τη διάγνωση βακτηρίων, μυκήτων και φυτοπλάσμάτων. Συγκεκριμένα, το 1977 οι Clark και Adams έδειξαν ότι μπορούσαν να χρησιμοποιούν ELISA επίσης για τους ιούς των φυτών. Από τότε η μέθοδος αυτή γνώρισε εξαιρετική ανάπτυξη και διάδοση και σήμερα θεωρείται σαν η βασική διαγνωστική μέθοδος για την ανίχνευση των κυριότερων ιών των φυτών στα φύλλα, βλαστούς, ρίζες και σπόρους. Η ELISA είναι σήμερα η πιο διαδεδομένη ορρολογική μέθοδος για την διάγνωση φυτικών ιών. Χρησιμοποιείται για εξετάσεις μεγάλου αριθμού δειγμάτων (επισκοπήσεις, παραγωγή υγιούς πολλαπλαστικού υλικού κλπ.).

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι: 1) Ευαισθησία, με δυνατότητες ανιχνεύσεως πολύ μικρών ποσοτήτων (συνήθως 1-10 *ng/ml*) αντιγόνου (ιού). 2) Ταχύτητα. Τα αποτελέσματα είναι συνήθως διαθέσιμα μέσα σε 48 ώρες. 3) Δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων (μαζικότητα εξετάσεων). 4) Μπορεί να εφαρμοσθεί τόσο σε εκχύλισμα φυτών (ορισμένοι ιοί, όπως οι ιοί των δένδρων, βρίσκονται στους ιστούς του ξενιστή σε μικρές συγκεντρώσεις) όσο και σε καθαρά παρασκευάσματα ιών. 5) Εξειδίκευση, για την διαφοροποίηση οροτύπων. 6) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση τεμαχισμένων αλλά και άθικτων ιοσωματίων. 7) Δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού του αντιγόνου (ιού). 8) Δυνατότητα αυτοματοποιήσεως και παραγωγής εμπορικών συσκευασμάτων (kits). 9) Χαμηλό κόστος και διατήρηση των αντιδραστηρίων για μεγάλο χρονικό διάστημα. 10) Δεν απαιτείται ακριβός εργαστηριακός εξοπλισμός. 11) Χρήση μικρών ποσοτήτων αντισωμάτων και αντιορρού.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες επί μέρους τεχνικές της ανοσοενζυμικής δοκιμής ELISA, οι οποίες ανήκουν σε δύο ομάδες, την άμεση ELISA και την έμμεση ELISA.

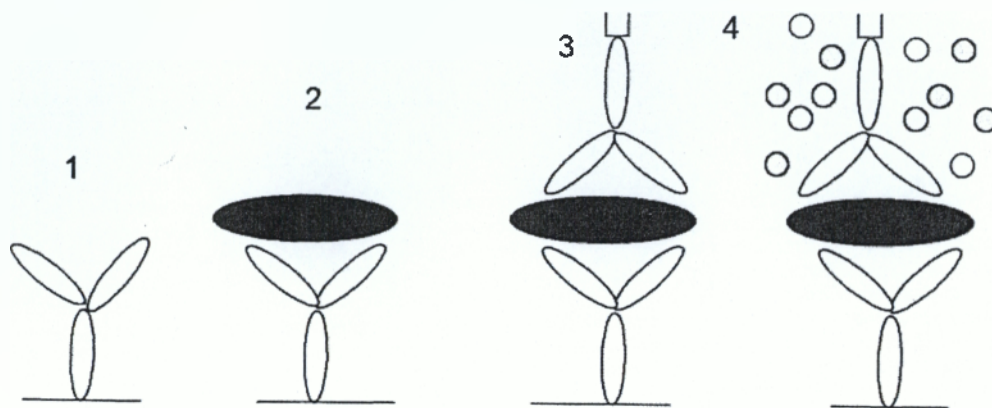
4.3.3 Άμεση ELISA

Η πιο συνηθισμένη άμεση ELISA είναι η DAS-ELISA από τους Clark και Adams (1977) και μέχρι σήμερα είναι η πιο διαδεδομένη. Η ELISA γίνεται σε μικροπλάκες πολυστυρενίου, συνήθως 96 φρεατίων.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι α) αντισώματα που έχουν απομονωθεί από τον αντιορρό β) σύζευγμα (conjugate) που έχει παρασκευασθεί με χημική ένωση κάθε μορίου αντισώματος με ένα ένζυμο συνήθως αλκαλική φωσφατάση, γ) υπόστρωμα του ενζύμου (αλκαλική

φωσφατάση). Τα φρεάτια της πλάκας πολυοτυρενίου καλύπτονται αρχικά με τα αντισώματα που έχουν απομονωθεί. Ακολουθεί επώαση για 2-4 ώρες στους 37°C, ώστε τα αντισώματα να προσκολληθούν στην πλάκα. Ακολουθεί καλή έκπλυση με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να παραμείνουν στα φρεάτια μόνο τα προσκολλημένα αντισώματα. Στη συνέχεια προστίθεται το δείγμα (αραιωμένο 1/10 έως 1/100) και η πλάκα αφήνεται για επώαση όλη την νύχτα στους 4°C. Την επόμενη ημέρα, γίνεται πάλι καλή έκπλυση της μικροπλάκας, τοποθέτηση της συζευγμένης γ-σφαιρίνης και επώαση για 2-4 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, γίνεται καλή έκπλυση και προστίθεται το ανάλογο υπόστρωμα. Στα φρεάτια όπου έχουν τοποθετηθεί τα θετικά δείγματα εμφανίζεται χρώμα, λόγω υδρόλυσης του υποστρώματος από το συζευγμένο ένζυμο. Αυτή η αλλαγή του χρώματος, ανάλογα με την συγκέντρωση του ιού στον χυμό, μπορεί να είναι ορατή με γυμνό οφθαλμό, αλλά βασικά καταγράφεται με ειδικό φωτόμετρο στα 405 nm. Για τη σύζευξη της γ-σφαιρίνης χρησιμοποιείται συνήθως το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση και η αναγνώριση του γίνεται με το υπόστρωμα φωσφορικό παρανιτροφαινύλιο (p-nitrophenylphosphate, PNP). Η υδρόλυση του υποστρώματος συνήθως αναστέλλεται με προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου ή θεικού οξέος στα φρεάτια της μικροπλάκας πριν από την μέτρηση της εντάσεως του χρώματος (απορροφήσεως). Με αυτό του τρόπο είναι δυνατή η διατήρηση των αντιδράσεων της πλάκας για μεταγενέστερη ανάγνωση.

Η DAS- ELISA έχει δύο μειονεκτήματα: 1) Μπορεί να είναι τόσο εξειδικευμένη, ώστε αντισώματα έναντι μιας φυλής να μην αναγνωρίζουν άλλη φυλή του ίδιου ιού. 2) Για την εκτέλεσή της απαιτεί την προετοιμασία ειδικού για κάθε ιό συζεύγματος ενζύμου αντισώματος.



Εικόνα 1: Τα 4 στάδια της διπλής άμεσης παρεμβολής σε διπλά αντισώματα.

4.3.4 Πολυκλωνικά αντισώματα

Πολυκλωνικά αντισώματα έναντι ενός αντιγόνου είναι το κλάσμα του αντιορού που περιέχει όλα τα αντισώματα έναντι αυτού του αντιγόνου. Ένας αντιορός περιέχει διάφορα αντισώματα έναντι του αντιγόνου που προκάλεσε την παραγωγή του, τα οποία όλα αντιδρούν εξειδικευμένα με το αντιγόνο, με τις διάφορες δεσμευτικές του θέσεις (binding sites). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ένα αντιγόνο φέρει επί της επιφανείας του διάφορες αντιγονικές θέσεις (επιτόπους), όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έναντι κάθε μίας από τις οποίες παράγεται ένα είδος αντισώματος. Δηλαδή, ο αντιορός είναι πολυκλωνικός.

Έτσι, μία ορρολογική αντίδραση στην οποία χρησιμοποιείται αντιορός είναι ουσιαστικά αντίδραση με πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου. Αυτό συμβαίνει συνήθως με τις μεθόδους της μικροκατακρημνίσεως, της διπλής διαχύσεως σε άγαρ και της ορροηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Στην μέθοδο ELISA, χρησιμοποιούνται

καθαρισμένα αντισώματα από τον αντιορρό και όχι αντιορρός, τουλάχιστον για την παρασκευή του συζεύγματος.

Τα πολυκλωνικά αντισώματα έχουν το πλεονέκτημα ότι παράγονται εύκολα και γρήγορα, με την παραγωγή του αντιορρού και τον καθαρισμό τους από αυτόν. Επίσης, έχουν την δυνατότητα να ανιχνεύουν πολλά στελέχη του ιού (αντιγόνου). Έχουν όμως το μειονέκτημα ότι είναι λιγότερο ευαίσθητα από τα μονοκλωνικά αντισώματα.

4.3.5 Μονοκλωνικά αντισώματα

Όπως είπαμε, κάθε Β-λεμφοκύτταρο παράγει αντισώματα ενός μόνο μοριακού είδους. Εάν το συγκεκριμένο Β-λεμφοκύτταρο αποκτήσει την ιδιότητα να πολλαπλασιάζεται, δηλαδή να παράγει κλώνο του σε μία κυτταροκαλλιέργεια, τότε όλα αυτά τα πανομοιότυπα μεταξύ τους κύτταρα παράγουν, αθροιστικά, μεγάλες ποσότητες αντισώματος του αυτού μοριακού είδους, δηλαδή τεράστιο αριθμό ομοίων μεταξύ τους μορίων (κλώνος μορίων), τα οποία ονομάζονται μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies, MAbs). Ποσότητες αρκετές να χρησιμοποιηθούν ως αντιδραστήρια. Εκρηκτική ήταν η ανάπτυξη του ενδιαφέροντος για χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά την 10-ετία του 1980 για διάφορα θέματα της ιολογικής έρευνας και κυρίως για διαγνωστικούς και ανιχνευτικούς σκοπούς.

Η φύση της εξειδικεύσεως των αντισωμάτων σε σχέση με τα μονοκλωνικά αντισώματα έχει ως εξής: Η θέση συνδέσεως (binding site) ενός MAbs ή κάθε ατομικού αντισώματος σε ένα πολυκλωνικό αντιορρό, είναι ικανή να συνδέεται με πολλούς αντιγονικούς προσδιοριστές (antigenic determinants) με διαφορετικό βαθμό χημικής συγγενείας. Δηλαδή, μία ατομική θέση συνδέσεως ενός αντισώματος είναι πολυλειτουργική

(polyfunctional). Περαιτέρω, αντισώματα έναντι μίας απλής αντιγονικής θέσεως ή επίτοπου (antigenic determinant, epitope) μπορεί να ποικίλλουν ως προς την χημική τους συγγένεια από μόλις μετρήσιμη με βασικές τεχνικές μέχρι χημική συγγένεια 100.000 φορές μεγαλύτερη (Matthews, 1992). Έτσι, είναι δυνατόν ένα αντίσωμα να ενώνεται πιο ισχυρά με ένα αντιγονικό προσδιοριστή διαφορετικό από εκείνον που προκάλεσε την παραγωγή του. Ένα τέτοιο φαινόμενο εύκολα περνάει απαρατήρητο από τα πολλά διαφορετικά αντισώματα σε ένα πολυκλωνικό αντιορό, αλλά με τα MAbs εκδηλώνεται σαφώς. Για διαγνωστικούς και ανιχνευτικούς σκοπούς, τα MAbs χρησιμοποιούνται συνήθως σε δοκιμές ELISA. Για πολλές εφαρμογές είναι ασφαλές να χρησιμοποιείται το ίδιο πρωτόκολλο ELISA που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό και την επιλογή του συγκεκριμένου Mab, διότι, ανάλογα με το πρωτόκολλο της ELISA, μπορεί να επιλεγούν διάφορα MAbs.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα πλεονεκτήματα είναι: α) Μικρές μόνο ποσότητες αντιγόνου (π.χ. 100 μg παρασκευάσματος) είναι απαραίτητες για την παραγωγή τους (≤ 100 μg) και δεν είναι απαραίτητη ή απόλυτη καθαρότητα του αντιγόνου από τις φυτικές πρωτεΐνες, αφού υπάρχει η δυνατότητα επιλογής υβριδώματος που παράγει αντιικά MAbs, β) Εξασφαλίζουν ομοιογενές αντιδραστήριο, το οποίο μπορεί να αποκτάται από διάφορα εργαστήρια, ώστε αυτά να έχουν συγκρίσιμα μεταξύ τους αποτελέσματα (υπό κατάλληλες συνθήκες μπορούν να λαμβάνονται απεριόριστες ποσότητες ενός MAb), γ) Έχουν απόλυτη εξειδίκευση, αφού ένα είδος MAb συνδέεται με μία μόνο αντιγονική θέση ενός αντιγόνου. Έτσι, αποτελούν ένα λεπτό εργαλείο, που μπορεί να χρησιμοποιείται για την διάκριση μεταξύ στελεχών ενός ιού ή για την ανίχνευση ενός γένους ιών. δ) Έχουν υψηλή χημική συγγένεια (affinity) για το αντιγόνο, αφού με αυτό μπορεί να επιλέγεται το αντίστοιχο υβρίδωμα. ε) Μπορούν να διατηρούνται σε υγρό άζωτο ώστε να υπάρχει

πηγή παραγωγής του αντίστοιχου MAb για μεγάλο χρόνο. Τα μειονεκτήματά τους είναι: α) Δυσκολία παραγωγής τους, β) Ανεπιθύμητα υψηλή εξειδίκευση για μερικές εφαρμογές, γ) Μεγάλη ευαισθησία σε αλλαγές της τριτοταγούς ή τεταρτοταγούς δομής του αντιγόνου. Έτσι, αν και τα μονοκλωνικά αντισώματα αποτελούν εξαιρετικό εργαλείο για πολλά θέματα της ιολογικής έρευνας, δεν φαίνεται να μπορούν να αντικαταστήσουν τα πολυκλωνικά σε όλες τις εφαρμογές.

4.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

4.4.1 Αρχή της PCR

Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, "in vitro". Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του 60.

Το DNA στόχος, επεκτείνεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Εκεί όπου τεχνικές υψηλής ευαισθησίας, όπως διάφορες τεχνικές μοριακού υβριδισμού (Southern, Northern) αποδεικνύονται ανεπαρκείς την PCR επιτυγχάνεται επέκταση του DNA στόχου, σε σημείο που να γίνεται ευχερώς ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές

αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Εν συνεχεία συνδέονται «υβριδίζονται» τα δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία καλούνται εκκινητικά μόρια ή και "primers" στις δυο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2ο στάδιο). Με τη δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητικού μορίου (primer) και η αλυσος επεκτείνεται (3ο στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δυο καινούργιες αλυσοι ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωση (denaturation) υβριδισμού των εκκινητικών μορίων (primers annealing) και επέκτασης των εκκινητικών μορίων με τη σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension) αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης PCR.

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητικά μόρια "primers", τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, ιόντα Mg^{++} απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.2 για τη δράση τον ενζύμου. Το ένζυμο Taq DNA είναι μια θερμοάαντοχη DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτηρίδιο *Thermus aquaticus* (Taq) και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργό ακόμη και στους + 95° C, θερμοκρασία η οποία απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA στόχου, επί 40 τουλάχιστον λεπτά.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον 4 και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2ο κύκλο. Στο τέλος του 2ου κύκλου οι κλώνοι θα είναι 8 και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων, αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός των ανατύπων του στόχου DNA, διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται

χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγέθυνση του DNA στόχου, 2^ο όπου n ο αριθμός των κύκλων.

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα 3 στάδια, μετουσίωσης, υβριδισμού και επέκτασης. Η μετουσίωση του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 92-95° C για 30 sec περίπου, ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C σε θερμοκρασία 50-65° C επί 1-2 min και τέλος η επέκταση των εκκινητικών μορίων (primers) σε θερμοκρασία 70-78° C επί 1-2 min. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα ν'ανεβοκατεβάζουν τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερομένων θερμοκρασιών, σε λιγότερο από 1 min για αυξομείωση θερμοκρασίας 40°C. Το DNA στόχος είναι δυνατόν να προέρχεται από ποικιλία δειγμάτων και μάλιστα σε μη καθαρή μορφή. Συνήθως 100 ng ολικού DNA είναι αρκετά για να επιτευχθεί η γονιδιακή επέκταση του DNA στόχου. Προϋπόθεση για την επέκταση του DNA στόχου είναι η ακεραιότητα του. Κατά συνέπεια ακόμα και θραύσματα γενετικού υλικού ιού, βιολογικά αδρανή, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με την PCR. Η αλληλουχία βάσεων του DNA στόχου είναι δυνατόν να είναι άγνωστη θα πρέπει όμως η αλληλουχία βάσεων των πλευρικών περιοχών του DNA στόχου να είναι γνωστή ώστε να κατασκευασθούν τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (primers).

Η PCR μπορεί επίσης να εφαρμοσθεί και για την γονιδιακή επέκταση RNA, αφού πρώτα το RNA μετατραπεί με τη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) και εν συνεχεία εφαρμοσθεί η τεχνική PCR. Με την αντίστροφη μεταγραφάση PCR (RT-PCR) είναι δυνατή η γονιδιακή επέκταση RNA ιών. Η επιλογή των εκκινητικών μορίων (primers) είναι μεγάλης σημασίας. Τα εκκινητικά

μόρια θα επιλεγθούν πάνω σε μεταβλητές περιοχές του DNA στόχου, το οποίο θα μεγεθυνθεί μεταξύ των 2 εκκινητικών μορίων. Το προϊόν της αντίδρασης PCR θα είναι το μεγεθυμένο τμήμα DNA το οποίο θα καθορίζεται από τα 2 εκκινητικά μόρια, τα οποία θα αποτελούν και τα άκρα του. Τα εκκινητικά μόρια, (συνήθως 15-25 νουκλεοτίδια) θα πρέπει να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C, να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3 ή 5 άκρο τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων ώστε να επιτρέπεται ο σχηματισμός του νέου κλώνου DNA. Τα εκκινητικά μόρια θα πρέπει επίσης να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία αποδιατάξεως ή τήξεως (T_m , melting temperature).

Η θερμοκρασία τήξεως υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο των Thein και Wallace: $T_m = (4 \times \text{αριθμός των βάσεων G+C}) + (2 \times \text{αριθμός των βάσεων A + T})$

Ένα επιθυμητό T_m θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 55-75°C. Η ειδικότητα της αντίδρασης οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στη θερμοκρασία υβριδισμού (T_a , annealing temperature) των εκκινητικών μορίων. Συνήθως η θερμοκρασία υβριδισμού T_a , επιλέγεται να είναι κατά 5 έως 10°C μικρότερη του T_m .

Η παρασκευή των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων γίνεται σε αυτόματες συσκευές, τους DNA συνθετητές.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνήθως πραγματοποιείται επί 25-40 κύκλους οπότε το τμήμα του DNA στόχου μεγεθύνεται 2^n (όπου n ο αριθμός των κύκλων).

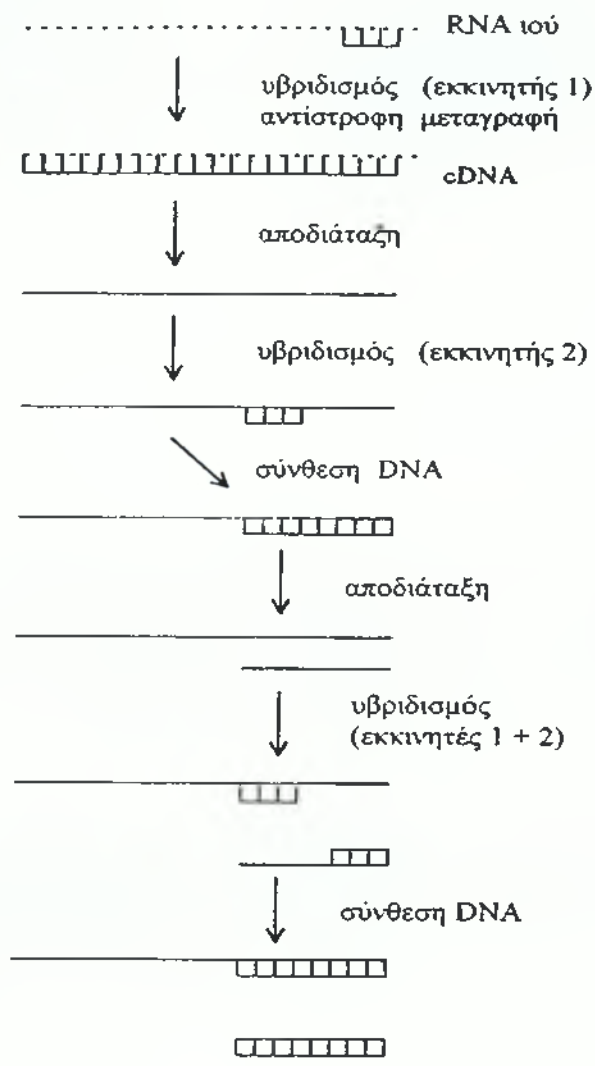
Αν υποθέσουμε ότι η απόδοση του συστήματος είναι 100% για κάθε κύκλο, τότε μετά από 25 κύκλους έχουμε την παραγωγή 2^{25} (33.554.432) αντιγράφων ενώ μετά από 40 κύκλους έχουμε την παραγωγή 2^{40} (1.099.511.627.716) αντιγράφων του εν λόγω DNA στόχου. Για την επιτυχή μεγέθυνση ο αριθμός των κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση

του DNA στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο μεγέθυνσης. Υπερβολικός αριθμός κύκλων οδηγεί σε αύξηση μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος από τον απαιτούμενο στην μη ανίχνευση του DNA στόχου. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι όταν ο αριθμός των μορίων του στόχου σε ένα βιολογικό υλικό είναι 10^5 απαιτούνται 30 κύκλοι, όταν είναι 10^4 απαιτούνται 35 κύκλοι ενώ όταν είναι 10^3 ή μικρότερος απαιτούνται 40-45 κύκλοι. Το κύριο προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι δίκλωνο DNA το οποίο περιβάλλεται από τα primers των οποίων τα 5' άκρα είναι και τα άκρα του προϊόντος της PCR. Το μέγεθος του σε ζεύγη βάσεων (bp) είναι ίσο με το άθροισμα των βάσεων των εκκινητικών μορίων και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA στόχου. Είναι δυνατόν κατά τους πρώτους κύκλους της PCR να σχηματισθούν μακρύτερα μονόκλινα μόρια DNA, τα οποία αποτελούν ένα ελάχιστο ποσοστό στο συνολικό προϊόν της PCR και συνεπώς δεν είναι ανιχνεύσιμα.

4.4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΔΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η ειδικότητα της PCR εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο η οποία εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία υβριδισμού (T_a). Όσο πιο κοντά είναι η T_a προς την T_m τόσο πιο πολύ η ειδικότητα αυξάνει. Η ειδικότητα εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωση ιόντων Mg^{++} , τον αριθμό των κύκλων, τη συγκέντρωση του ενζύμου Taq πολυμεράση καθώς και από τη συγκέντρωση των εκκινητικών μορίων και του DNA στόχου. Η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε βέλτιστες συνθήκες επιβεβαιώνεται σαν ένα ομοιογενές προϊόν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης, το μέγεθος του

οποίου ταυτίζεται με το μέγεθος του DNA στόχου. Το ομοιογενές προϊόν της PCR συνήθως προσδιορίζεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη, παρουσία βρωμιούχου εθιδίου (1μg/ml). Το βρωμιούχο εθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων νουκλεοτιδίων και φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας αποκαλύπτοντας το προϊόν της PCR.



Εικόνα 2 : Τα στάδια της αντίστροφης μεταγραφής (RT) και των κύκλων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εργασία που περιγράφεται στο πειραματικό μέρος της πτυχιακής μελέτης αποτελεί μέρος του ερευνητικού Προγράμματος που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Σκοπός του προγράμματος ήταν η μελέτη της ικανότητας διαφόρων απομονώσεων του ιού Υ της πατάτας να προκαλέσουν συμπτώματα της ασθένειας, της νεκρωτικής δακτυλιωτής κηλίδωσης των κονδύλων της πατάτας.

Μέχρι τώρα οι απομονώσεις που θεωρούνταν ικανές να προκαλέσουν τα συμπτώματα της ασθένειας PTNRD ήταν οι NTN του PVY. Όμως κάποιες απομονώσεις N του PVY μπορούν να προκαλέσουν τα ίδια συμπτώματα σε κάποιες ευαίσθητες κυρίως ποικιλίες πατάτας και όταν βρεθούν σε συνθήκες εντομοστεγούς κλωβού. Έτσι κρίθηκε αναγκαίο να βρεθεί ένας τρόπος, μεταξύ των απομονώσεων, για το πόσο είναι ικανές να εκδηλώσουν τα συμπτώματα της PTNRD. Για αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρεις ευαίσθητες ποικιλίες πατάτας όπου από το ποσοστό των συμπτωμάτων στους κονδύλους έγινε μία κατάταξη των απομονώσεων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό και απομονώσεις του ιού

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν διάφορες απομονώσεις του PVY. Οι απομονώσεις βρίσκονταν σε αποξηραμένο φυτικό υλικό και όλα, εκτός της ελληνικής PVY24 είχαν σταλθεί από το εξωτερικό. Η απομόνωση PVY24 υπήρχε διατηρημένη σε φυτά καπνού *Nicotiana tabacum* στο θερμοκήπιο του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Συνολικά οι απομονώσεις του ιού Υ που χρησιμοποιήθηκαν

ήταν 9 και είναι οι *PVY^O Sc*, *PVY^C*, *PVY^N -Wi - P*, *PVY^N -605*, *PVY^N -154*, *PVY^{NTN} -H*, *PVY^{NTN} -NZ*, *PVY^{NTN} - Fr -Orl*, *PVY24 - Gr*. Οι απομονώσεις *PVY^O Sc*, *PVY^C*, *PVY^N -154* προέρχονται από την Σκωτία, η *PVY^N -605* από Σουηδία, η *PVY^N -Wi - P* από Πολωνία, η *PVY^{NTN} -H* από Ουγγαρία, η *PVY^{NTN} -NZ* από Νέα Ζηλανδία, η *PVY^{NTN} - Fr -Orl* από την Γαλλία και η *PVY24 - Gr* είναι η ελληνική.

Οι απομονώσεις μεταφέρθηκαν σε φυτά καπνού *Nicotiana tabacum* από όπου και πήραμε το αρχικό μόλυσμα για την μεταφορά στα φυτά πατάτας.

Το φυτικό υλικό στο πείραμα για την εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας της νεκρωτικής δακτυλιωτής κηλίδωσης των κονδύλων της πατάτας (PTNRD) ήταν φυτά *Solanum tuberosum*. Χρησιμοποιήθηκε πιστοποιημένος πατατόσπορος από τρεις ευαίσθητες ποικιλίες cv.Hermes ,cv. Nadine και cv. Nicola.

2.2 Πειραματικές συνθήκες και μηχανική μόλυνση

Η φύτευση έγινε σε γλάστρες οι οποίες διατηρήθηκαν σε συνθήκες εντομοστεγούς κλωβού. (Εικ.3). Για την μηχανική μετάδοση πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των φύλλων καπνού με τη βοήθεια φωσφορικού διαλύματος. Η αντιστοιχία ήταν 5 φυτά από κάθε ποικιλία με κάθε απομόνωση. Υπήρχε και ο υγιής μάρτυρας στον οποίο έγιναν μηχανικές μολύνσεις με ιστό από υγιή φυτά καπνού. Έτσι συνολικά ο αριθμός των φυτών ήταν 150.

Η φύτευση έγινε στις αρχές του Απρίλη 2003 και μετά από ένα χρονικό διάστημα 20 ημερών έγιναν οι μηχανικές μολύνσεις. Μετά από διάρκεια 3,5 μηνών, αφού τα περισσότερα φυτά είχαν καταρρεύσει από τα συμπτώματα της ασθένειας, έγινε η συλλογή των κονδύλων και η καταγραφή - παρατήρηση των νεκρωτικών συμπτωμάτων.



Εικόνα 3: Υγιή φυτά πριν την μόλυνση

2.3 Μέθοδος ELISA και έλεγχος φυτικού υλικού

2.3.1 Εκτέλεση της μεθόδου

Αρχικά για τον έλεγχο της φυτουγείας του φυτικού υλικού της πατάτας εφαρμόστηκε η τεχνική της διπλής παρεμβολής (DAS-ELISA). Για την πραγματοποίηση της δοκιμής ELISA χρειάζονται ένα πλαστικό υποστήριγμα (πλάκα πολυστυρενίου) , τα εξειδικευμένα αντισώματα των ιών που αναζητούμε (ανοσοσφαιρίνες IgG) , τα ίδια τα αντισώματα συζευγμένα με ένα ένζυμο και ένα υπόστρωμα του ενζύμου.

2.3.2 Συνθήκες πραγματοποίησης της δοκιμής ELISA

Σε αυτή την εφαρμογή της ELISA εξετάστηκε όλο το φυτικό υλικό με την χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων. Και τα 150 δείγματα εξετάστηκαν με την ορολογική μέθοδο DAS –ELISA για τους ιούς *PVA* , *PVX* , *PLRV* (Potato leafroll virus), *PVM* , *PVS* , *PVV* , *TBRV* , *PMTV* και *PVY*.

Η πλειοψηφία των χειρισμών πραγματοποιείται σε ένα φωσφορικό διάλυμα 0,02M στο οποίο έχει προστεθεί NaCl με pH ουδέτερο (PBS). Με την προσθήκη Tween (απορρυπαντικό με αμμωνία) μέσα στο διάλυμα, αποφεύγεται κάθε απορρόφηση πάνω στα τοιχώματα της πλάκας. Στο διάλυμα ομογενοποίησης προστίθεται polyvinyl – pyrrolidone (PVP) που έχει σαν σκοπό τη σταθεροποίηση του ιού. Η ομογενοποίηση των δειγμάτων έγινε σε αναλογία 1/10 (w/v), με το σύνηθες ρυθμιστικό διάλυμα (PBS –Tween – PVP).

Το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης των αντισωμάτων είναι ένα ανθρακικό διάλυμα (χωρίς Tween) με pH βασικό 9,6 που επιτρέπει την προσκόλληση των αντισωμάτων πάνω στην πλάκα.

Κατά τον ίδιο τρόπο το διάλυμα του υποστρώματος έχει ένα PH σχετικά

υψηλό 9,8 για να επιτρέψει τη δράση του ενζύμου (αλκαλική φωσφατάση). Η συντήρηση και οι συνθήκες χρησιμοποίησης των αντιδραστηρίων παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 και η σύνθεση των χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων στον Πίνακα 2.

	Συντήρηση	Ρυθμιστικά Διαλύματα (Συντήρηση στους 4°C)	Συγκέντρω- ση
Βιολογικά αντιδραστήρια	Στο PBS		
Σύζευγμα	4°C	PBS + Tween 0,05%+PVP 2%	1/500 – 1/2000
Ανοσοσφαιρίνες IgG	-20°C	Ανθρακικό διάλυμα PH 9,6 PBS+Tween	1μg-5μg/ml
Χημική αντίδραση υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης P- nitrophenyl phosphate	-20°C	Διαιθανολαμίνη 10% PH 9,8	1mg/ml
Φυτικό υλικό	4°C	PBS-Tween 0.05% + PVP 2%	

Πίνακας 1: Συνθήκες χρησιμοποίησης των αντιδραστηρίων ELISA

<u>Διάλυμα PBS</u>	<u>x10(αr)</u>
NaCl	80
KH ₂ PO ₄	2
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	29
KCl	2
NaN ₃	2
Προσθήκη απεσταγμένου H ₂ O έως τελικό όγκο 1000ml+NaOH PH=7,4	
<u>Διάλυμα PBS-Tween:διάλυμα PBS+Tween 20 0.05%</u>	
<u>Διάλυμα PBS-Tween-PVP:διάλυμα PBS+Tween 20 0.05%+PVP 2%</u>	
<u>Ανθρακικό διάλυμα</u>	<u>(αr)</u>
Na ₂ CO ₃	1,59
NaHCO ₃	2,93
NaNH ₃	0,2
Προσθήκη απεσταγμένου H ₂ O έως τελικό όγκο 1000ml + HCl PH=9,6	
<u>Διάλυμα διαιθανολαμίνης</u>	
Διαιθανολαμίνη	97ml
H ₂ O	800ml
NaN ₃	0,2gr
Προσθήκη απεσταγμένου H ₂ O έως τελικό όγκο 1000ml + HCl PH=9,6	

Πίνακας 2:Σύνθεση χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων

2.3.3 Περιγραφή της δοκιμής

Η δοκιμή περιλαμβάνει τέσσερα διαδοχικά στάδια τα οποία μπορούν να πραγματοποιηθούν σε 48 ώρες.

1^ο Στάδιο:

Προσρόφηση των αντισωμάτων (IgG) πάνω στην πλάκα	200μl (ανθρακικό ρυθμιστικό διάλυμα). Χρόνος επώασης 3-6h στους 37 ^o C.
Πλύσιμο της πλάκας	3 φορές από 5 min με PBS-Tween
Δημιουργία του συμπλόκου αντιγόνου/αντίσωμα	Προσθήκη 200μl φυτικού δείγματος/κυψελίδα (διάλυμα ομογενοποίησης PBS-Tween-PVP). Χρόνος επώασης 18h στους 4 ^o C.

2^ο Στάδιο:

Πλύσιμο της πλάκας	3 φορές από 5 min με PBS-Tween
Σταθεροποίηση του συζεύγματος πάνω στο σύμπλοκο	Προσθήκη συζεύγματος (conjugate) 200μl (διάλυμα PBS-Tween). Χρόνος επώασης 3-4h στους 37 ^o C
Πλύσιμο της πλάκας	3 φορές από 5 min με PBS-Tween

3^ο Στάδιο:

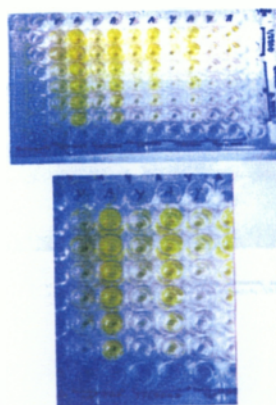
Αποκάλυψη	Προσθήκη υποστρώματος 200μl (διάλυμα διαιθανολαμίνης). Χρόνος επώασης 5min-2h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
-----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4^ο Στάδιο:

Οπτική εκτίμηση ή ανάγνωση της οπτικής πυκνότητας με την χρησιμοποίηση ειδικού φωτομέτρου για την δοκιμή ELISA.

2.3.4. Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η οπτική εκτίμηση γίνεται με μια απλή ματιά όπου μπορούμε να διαπιστώσουμε πάνω στην πλάκα τα μολυσμένα δείγματα (αλλαγή χρώματος). (Εικ.4)



Εικόνα 4. Πλάκες ELISA με τις κίτρινες περιοχές να αντιπροσωπεύουν τα μολυσμένα δείγματα.

Για περισσότερη ακρίβεια ο προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας σε κάθε φρεάτιο πραγματοποιείται με την βοήθεια ενός φωτομέτρου ELISA. Η οπτική πυκνότητα των τυφλών ρυθμίζεται στο 0 (μηδέν). Η ανάγνωση γίνεται σε μήκος κύματος 405nm. Όσο μεγαλύτερη είναι η οπτική πυκνότητα (πιο έντονος χρωματισμός) τόσο η συγκέντρωση σε αντιγόνα είναι πιο σημαντική.

Θετικά θεωρούνται όσα δείγματα έδωσαν οπτική απορρόφηση τουλάχιστον 2 φορές μεγαλύτερη από τον μέσο όρο των απορροφήσεων των 2 μαρτύρων. Ο προληπτικός έλεγχος για τις αναφερόμενες ασθένειες, όπως ήταν αναμενόμενο, παρουσίασε αρνητικά αποτελέσματα.

2.4 Ανοσοδέσμευση RT-PCR (IC-PCR)

Στην εργασία μας για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου της του PVY χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές των Weidemann και Maiss με την μέθοδο IC-RT-PCR οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί για να αναγνωρίζουν απομονώσεις του PVY^{NTN}. Ο καθοδικός και ανοδικός εκκινητής παράγουν ένα προϊόν το οποίο αντιστοιχεί σε 835 ζεύγη βάσεων από την νουκλεοτιδική θέση 103-907.

Έγινε και δεύτερη PCR στους κόνδυλους (συμπτωματικούς και μη), για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVY, κάτι το οποίο μας ενδιέφερε αφού κόνδυλοι οι οποίοι δεν είχαν συμπτώματα, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης τους πιθανόν να εμφανίζουν. Χρησιμοποιήθηκαν 100μl ομογενοποιημένου δείγματος από φύλλα πατάτας μετά από φυγοκέντρωση σε 10.000rpm για 10min. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σωληνίσκους της PCR (Perkin Elmer) όπου είχαν προηγουμένως προσροφηθεί ανοσοσφαιρίνες (IgG)

έναντι του ιού Υ σε συγκέντρωση 2μg/ml. Στη συνέχεια ακολουθούν δύο πλυσίματα με PBS-Tween και ένα με αποσταγμένο νερό. Ακολούθως, προστίθεται μείγμα 33.5μl (6.3 mM Tris-HCl pH 8.3, 9.5 mM KCL, 0.38 mM MgCl₂, 0.35 μg primer1) σε κάθε σωληνίσκο. Έγινε ανάδευση στο Vortex και στη συνέχεια το μείγμα θερμαίνεται για 5 min στους 65⁰C, για την αποδιάταξη της έλικας DNA ,15 min στους 45⁰C και τοποθετείται στον πάγο 4⁰C, ώστε να διατηρηθεί σε αυτή την κατάσταση και μην έχουμε συσπείρωση. Ένα μείγμα cDNA 17,5μl [143 mM Tris-HCl pH 8,3, 214 mM KCL, 8,5 mM MgCl₂, 29 mM DTT, 0,5 mM από κάθε dNTP, 20 U RNase Inhibitor (Life Technologies, Paisley, Scotland, UK), 200 U M-MLV RT (Life Technologies)] προστέθηκε και η αντίδραση της RT παρέμεινε στους 37⁰C για 1h.

Στη συνέχεια έγινε η αντίδραση της PCR. Σε ποσότητα 5μl από την πρώτη αντίδραση προστίθενται σε 45μl PCR mix [22 mM Tris-Cl, pH 8,4, 2.2 mM MgCl₂, 55 mM KCl, 222 μM dNTPs, 1mg primer 2, 2 U *Taq* DNA polymerase (Life Technologies)]. Στη συνέχεια οι σωληνίσκοι τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή (MJ Research Inc.USA) και επωάστηκαν για 5 min στους 94⁰C, ακολούθησαν 30 κύκλοι 40 sec στους 94⁰C, 45 sec στους 51⁰C, 60 sec στους 72⁰C και ένας τελευταίος κύκλος 10 min στους 72⁰C. Τα προϊόντα , 10μl από το καθένα, ανιχνεύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE (89mM tris-βορικό, 89mM βορικό οξύ, 2mM EDTA). Στην πηκτή αγαρόζης προστέθηκε 0,2μg/ml βρωμιούχο αιθύδιο. Το μέγεθος των ζωνών DNA εκτιμήθηκε βάση μάρτυρα μοριακού βάρους DNA (1kb, Gibro-BRL), έτσι ώστε τα μόρια DNA να γίνονται ορατά κάτω από υπεριώδες φως.

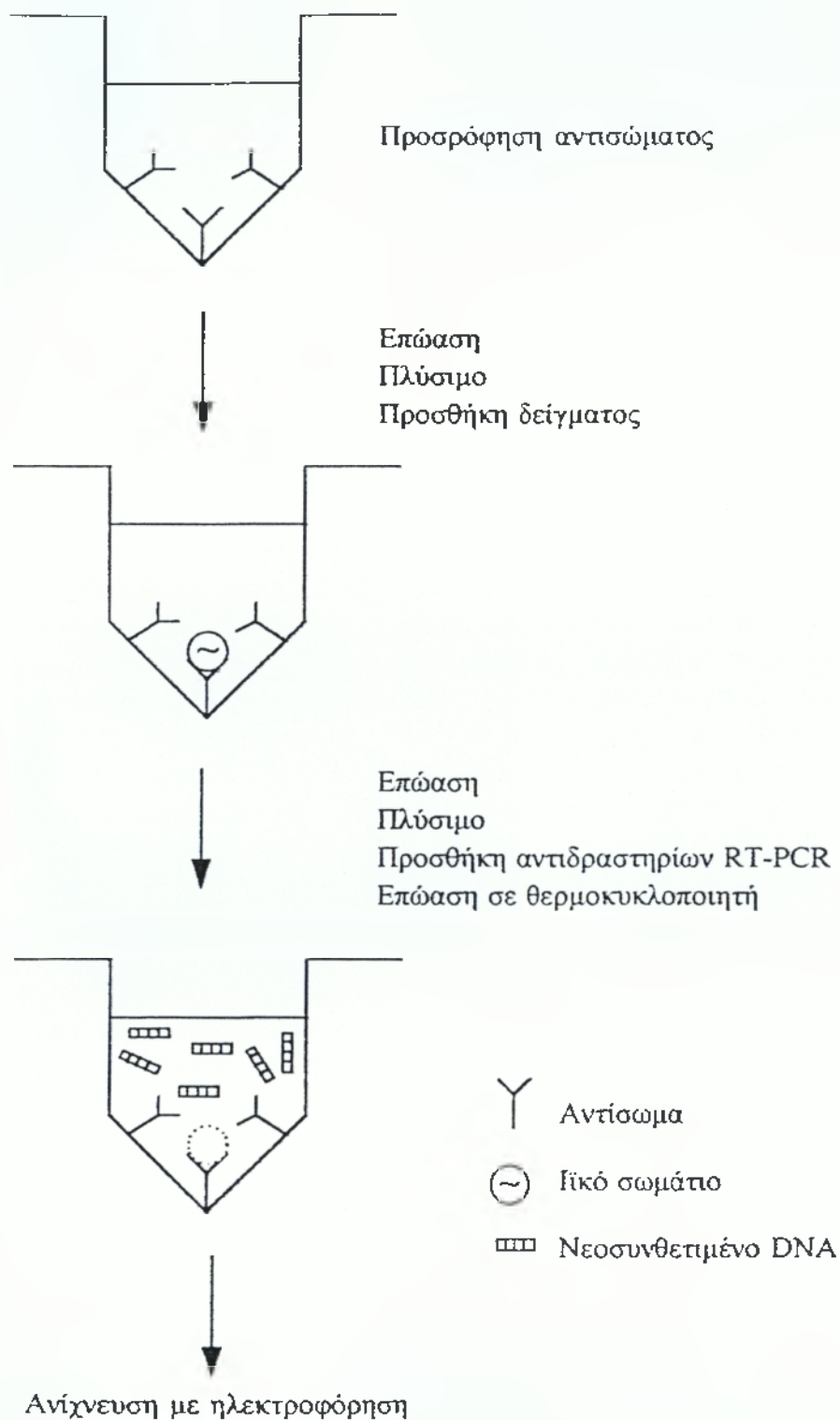
Κατά την αντίδραση της RT-PCR γίνονται τα εξής:

Πρώτα γίνεται ο υβριδισμός μεταξύ του εκκινήτη 1 που είναι συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό μιάς αλληλουχίας του RNA του ιού. Τη δομή αυτή αναγνωρίζει το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και

συνθέτει το συμπληρωματικό DNA. Μετά από θέρμανση του μείγματος και αποδιάταξη των μορίων λαμβάνεται το μονόκλωνο DNA που αφού υβριδισθεί με τον εκκινητή 2 σε μια άλλη θέση, θα χρησιμοποιηθεί από την Taq πολυμεράση σαν μήτρα για την σύνθεση της συμπληρωματικής ως προς αυτό αλυσίδας. Ένας δεύτερος κύκλος αποδιάταξης των αλυσίδων με θέρμανση, υβριδισμού με τους εκκινητές 1 και 2 στις αντίστοιχες συμπληρωματικές θέσεις και σύνθεσης DNA, θα οδηγήσει στην παραγωγή δυο μορίων DNA. Σε κάθε κύκλο δηλαδή της PCR διπλασιάζονται τα μόρια DNA έτσι ώστε θεωρητικά μετά από n κύκλους παίρνουμε 2^n μόρια.

<u>Διάλυμα PBS</u>	<u>x10 (gr)</u>
NaCl	80
KH ₂ PO ₄	2
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	29
KCl	2
Προσθήκη αποσταγμένου H ₂ O έως τελικό όγκο 1000ml+NaOH pH=7,4	
Διάλυμα PBS1x-Tween: διάλυμα PBS1x-Tween 20 0,05%	
Διάλυμα PBS-Tween-PVP-DIECA: διάλυμα PBS1x-Tween +2% PVP+0,2% DIECA	
<u>Ανθρακικό διάλυμα</u>	<u>(gr)</u>
Na ₂ CO ₃	0,318
NaHCO ₃	0,586
Προσθήκη H ₂ O Millipore έως τελικό όγκο 200ml+HCl pH=9,6	
<u>TBE 10x</u>	<u>gr/lit</u>
Tris	108
Boric Acid	55
EDTA	9.3
STOC GEL 1,5%: 200 ml TBE 1x + 3 gr Agarose	

Πίνακας 3:Σύνθεση χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων της PCR



Εικόνα 5:ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ IC - PCR

2.5 Εκτίμηση δείκτη ασθένειας (Τύπος)

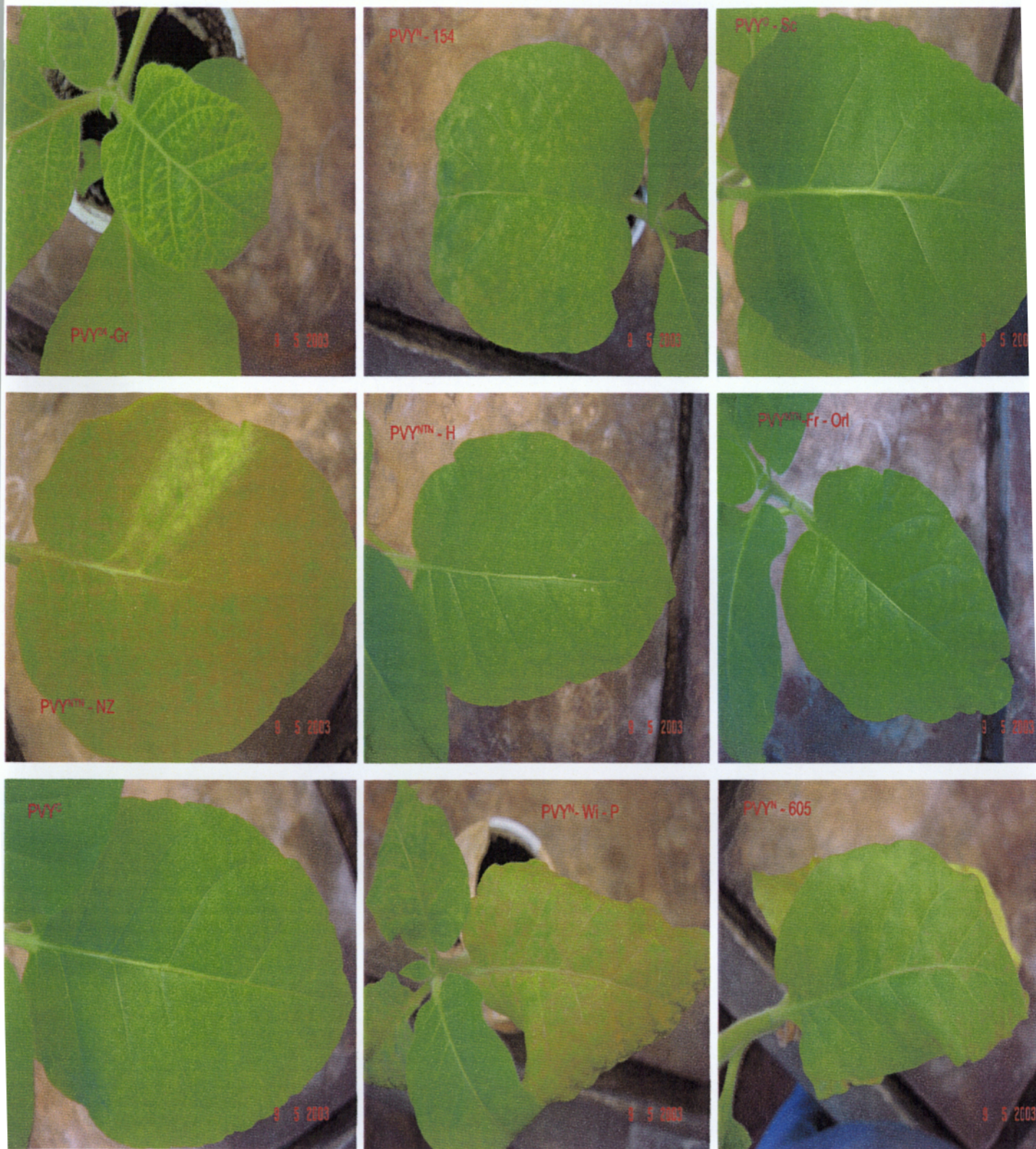
Για τον διαχωρισμό μεταξύ των νεκρωτικών κονδύλων δημιουργήθηκε ένας δείκτης ασθένειας με κλίμακα από 1 έως 9. Οι συμπτωματικοί κόνδυλοι διαχωρίζονται ως εξής: Αν η νεκρωτική επιφάνεια είναι μικρότερη από 25% της συνολικής τότε ανήκει στην Α κατηγορία, αν είναι 25-75% στην Β ενώ πάνω από 75% στην C. Ο δείκτης ασθένειας υπολογίζεται από τον τύπο: $\Delta.A.=1,14x$ κατηγορία x αριθμό συμπτωματικών κονδύλων / συνολικό αριθμό κονδύλων. Για την κατηγορία Α αντιστοιχεί ο αριθμός 0,125 για την κατηγορία Β 0,500 και για την C 0,875

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Χαρακτηριστικά απομονώσεων

3.1.1. Βιολογικός έλεγχος

Οι βιολογικοί χαρακτήρες αφορούν τη συμπτωματολογία φυτών δεικτών όπως ο καπνός που επιτρέπει την κατάταξη των στελεχών του ιού σε νεκρωτικά, N ή κοινά O. Τα νεκρωτικά στελέχη προκαλούν νέκρωση των νεύρων στα φύλλα καπνού, ενώ τα κοινά μια απλή διαφάνεια των νευρώσεων. Η νεκρωτική υποομάδα PVY^{NTN} προκαλεί πολύ έντονα νεκρωτικά συμπτώματα που οδηγούν στην παραμόρφωση των φύλλων της κορυφής και στη νέκρωση των φύλλων της βάσης. Έγιναν μηχανικές μολύνσεις σε φυτά καπνού *Nicotiana tabacum*. Τα συμπτώματα στους καπνούς εμφανίστηκαν μετά από 7 ημέρες και ανάλογα με την απομόνωση είχαμε ήπιο ή τραχύ μωσαϊκό και αλλού τοπική ή διασυστηματική νέκρωση. Οι παρακάτω απομονώσεις, PVY²⁴ - Gr, PVY^N - Wi - P, PVY^N - 605, PVY^N - 154, PVY^{NTN} - H, PVY^{NTN} - NZ, PVY^{NTN} - Fr - Ori έδωσαν νεκρωτικά συμπτώματα. (Εικ.6)



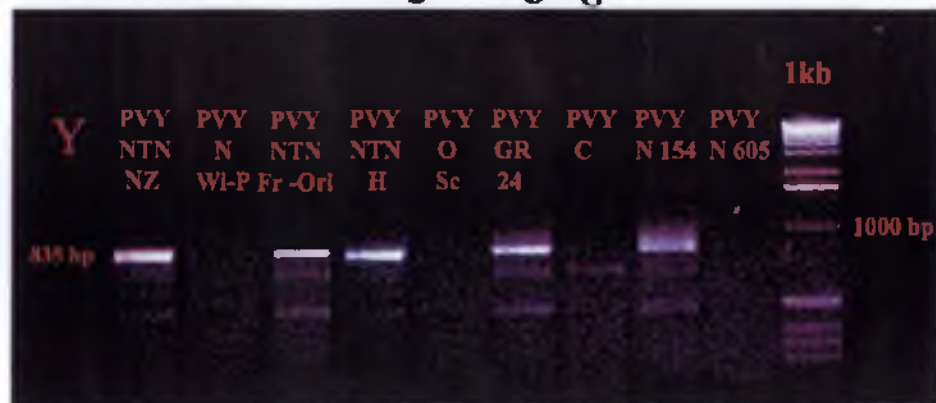
Εικόνα 6: Συμπτώματα των διαφόρων απομονώσεων του ιού Υ της πατάτας σε φυτά καπνού

3.1.2. Μοριακός έλεγχος

Οι εκκινητές των Weidemann και Maiss σχεδιασμένοι για τα στελέχη PVY^{NTN} έδωσαν σε πέντε από τα εννιά στελέχη το χαρακτηριστικό προϊόν των 835 ζευγών βάσεων. Και οι πέντε απομονώσεις εμφάνισαν την ασθένεια της δακτυλιωτής κηλίδωσης των κονδύλων της πατάτας (PTNRD) στο θερμοκήπιο. Τα στελέχη PVY^O και PVY^C στον έλεγχο με την μέθοδο PCR δεν έδωσαν το αντίστοιχο προϊόν καθώς επίσης δεν εμφάνισαν και συμπτωματικούς κονδύλους.

Η μέθοδος της IC-PCR εφαρμόστηκε για όλες τις απομονώσεις του ιού Y της πατάτας που εξετάστηκαν. Στην Εικόνα 7 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της IC-PCR. Ο υγιής μάρτυρας δεν έδωσε κανένα προϊόν ενίσχυσης του DNA όπως ήταν αναμενόμενο.

IC - PCR



Εικόνα 7: Αποτελέσματα της IC-PCR. Ο Υγιής μάρτυρας όπως ήταν αναμενόμενο δεν έχει δείξει κανένα προϊόν ενώ πέντε από τις εννιά απομονώσεις έχουν δώσει το χαρακτηριστικό προϊόν των 835 ζ.β.

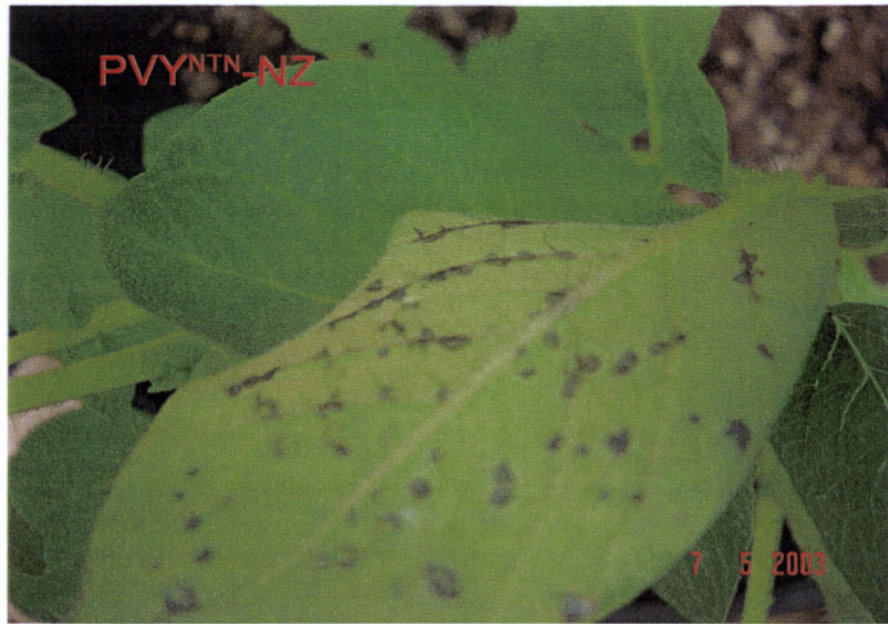
Οι απομονώσεις που ανήκουν στην υποομάδα του PVY^{NTN} έδωσαν το χαρακτηριστικό προϊόν των 835 ζευγών βάσεων. Το ίδιο προϊόν έδωσε και η απομόνωση PVY^N-154. Παρατηρούμε ότι οι απομονώσεις που ανήκαν

στην ομάδα O, C δεν έχουν δώσει το προϊόν ενίσχυσης του DNA κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο. Η απομόνωση PVY^N-Wi-P δίνει νεκρωτικά συμπτώματα σε φυτά καπνού ενώ σε φυτά πατάτας αντιδρά με πιο ήπια συμπτώματα.

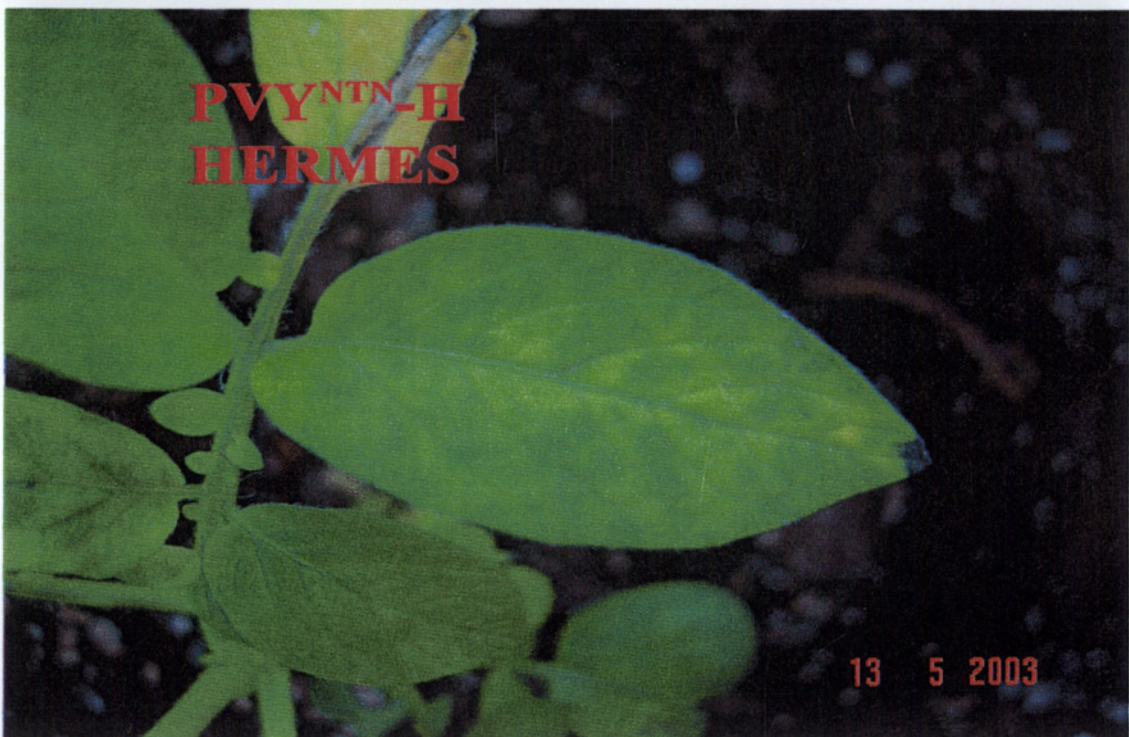
3.2. Εκδήλωση συμπτωμάτων του ιού

3.2.1. Εκδήλωση επί των φυτών πατάτας

Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν στο διάστημα των 10 ημερών μετά τις μολύνσεις και ήταν μόνο στα φύλλα όπου είχε γίνει μηχανική μόλυνση. Τα συμπτώματα αυτά χαρακτηρίζονταν από μαύρες κηλίδες στην κάτω επιφάνεια των φύλλων στα φυτά της πατάτας.(Εικ.8) Οι ποικιλίες όπως έχουμε προαναφέρει που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα ήταν η cv.Nadine,Hermes και Nicola. Πιο ευαίσθητη από τις τρεις αποδείχθηκε η Nadine μετά ακολούθησε η Hermes και τέλος η Nicola. Μετά το πέρας του πρώτου μήνα τα συμπτώματα είχαν γίνει πολύ έντονα και σε όλο το φυτό. Το έντονο μωσαϊκό στις ποικιλίες με νεκρωτικά στελέχη ήταν ορατό.(Εικ.9). Στον δεύτερο μήνα τα συμπτώματα εξελίχθηκαν σε νεκρωτικά και είχαμε παραμόρφωση των φύλλων της κορυφής και νέκρωση στις νευρώσεις των φύλλων της βάσης, κιτρίνισμα των φύλλων τα οποία και παρέμεναν πάνω στο φυτό ή έπεφταν από αυτό.(Εικ.10) Η εξέλιξη των συμπτωμάτων και ο χαρακτήρας τους, στις ποικιλίες που είχαν μολυνθεί με τα στελέχη PVY^O και PVY^C, ήταν τόσο έντονος όσο και στα νεκρωτικά στελέχη. Στον τρίτο μήνα τα περισσότερα φυτά είχαν καταρρεύσει με τα παραμορφωμένα φύλλα να έχουν παραμείνει πάνω σε αυτά. (Εικ.11)



Εικόνα 8: Αρχικά συμπτώματα στην πάνω και κάτω επιφάνεια των φύλλων



Εικόνα 9: Έντονο μωσαϊκό μετά από διάστημα 3 εβδομάδων από την μόλυνση



Εικόνα 10: Έντονα συμπτώματα με νεκρωτικά δαχτυλίδια και νέκρωση των νευρώσεων



Εικόνα 11: Κατάρρευση των φυτών μετά από διάστημα 2,5 μηνών

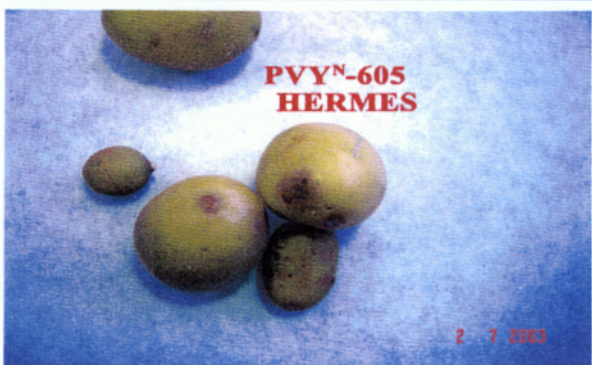
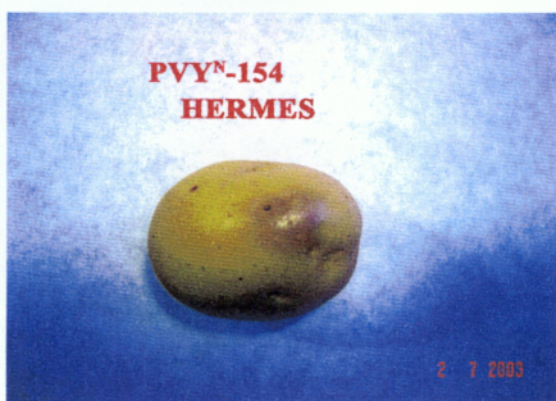
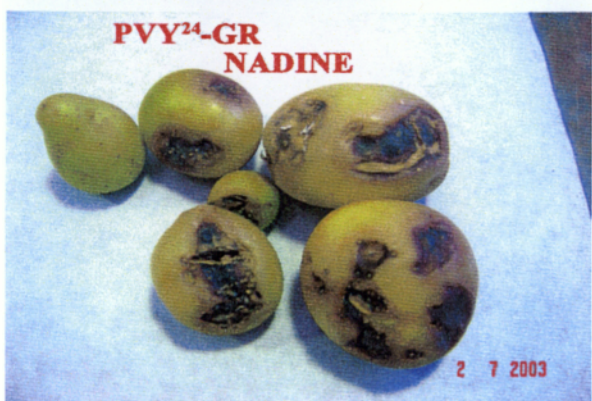
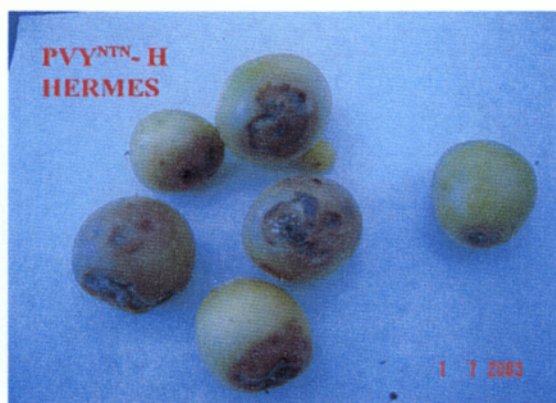
3.2.2. Εκδήλωση επί των κονδύλων

Μετά το τέλος του τρίτου μήνα και αφού σχεδόν όλα τα φυτά είχαν καταρρεύσει, εκτός από τα υγιή, έγινε η συλλογή των κονδύλων από κάθε φυτό και η καταμέτρησή τους. Όλοι οι κόνδυλοι καθαρίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά κυπελλάκια όπου είχε σημειωθεί ο αριθμός της γλάστρας, η ποικιλία και η απομόνωση του ιού Υ με το οποίο είχε μολυνθεί. (Εικ. 12). Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. (22°C). Η πρώτη παρατήρηση έγινε μετά από τέσσερις εβδομάδες όπου και είχαμε νεκρωτικά συμπτώματα σε κονδύλους. (Εικ.13). Η συχνότητα των επόμενων παρατηρήσεων ήταν ανά δυο εβδομάδες. Μετά το τέλος των 2.5 μηνών μετά την συλλογή δεν υπήρχε εμφάνιση καινούργιων κονδύλων με νεκρωτικά συμπτώματα.

Από τις εννιά απομονώσεις του Υ στις πέντε είχαμε συμπτώματα νεκρωτικά στους κονδύλους. Από την μοριακή ανάλυση φαίνεται ότι το στέλεχος PVY^N-154 διαθέτει NTN χαρακτήρα όπως και το στέλεχος PVY²⁴-GR. Τα στελέχη PVY^O Sc, PVY^C, PVY^N-Wi-P και PVY^N-605, δεν έδωσαν νεκρωτικά συμπτώματα στους κονδύλους. Το μεγαλύτερο αριθμό σε κονδύλους με νεκρωτικά συμπτώματα από τις ποικιλίες έδωσε η Nadine, ακολούθησε η Hermes και τέλος η Nicola. Οι κόνδυλοι οι οποίοι δεν εμφάνιζαν συμπτώματα ελέγχθηκαν με την μέθοδο ELISA και εμφανίστηκαν θετικοί.



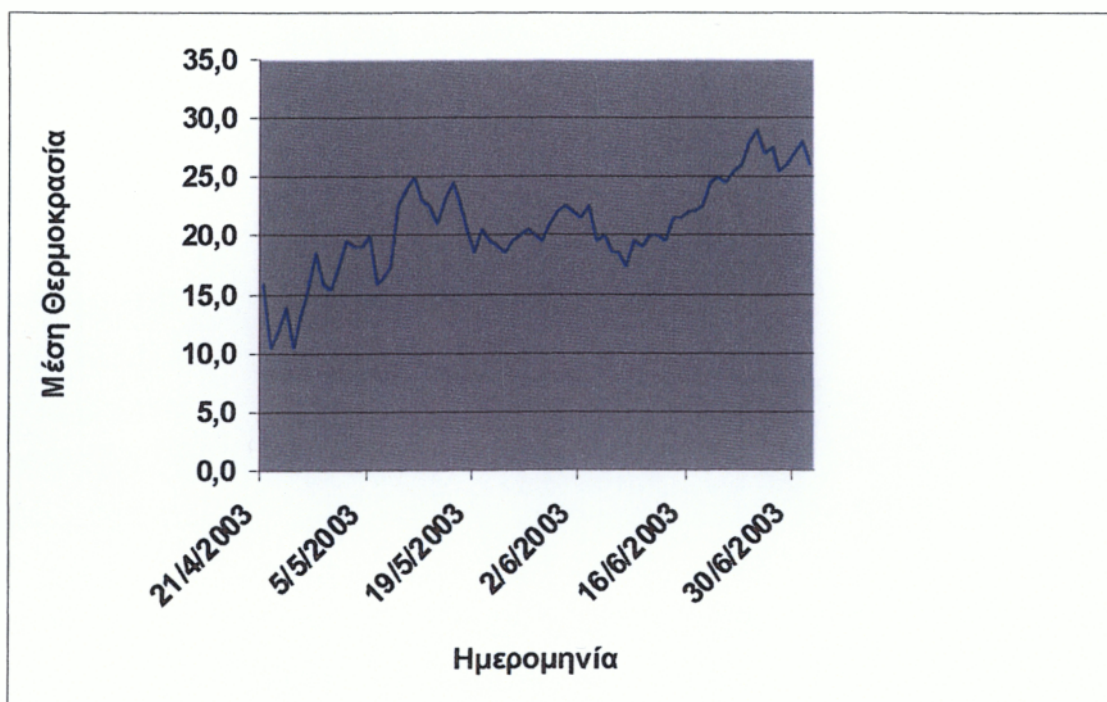
**Εικόνα 12: Συλλογή και καταμέτρηση των κονδύλων σε πλαστικά
κυπελλάκια**



Εικόνα 13: Συμπτώματα της ασθένειας PTNRD σε κονδύλους πατάτας

3.3 Διακύμανση Θερμοκρασίας

Σε όλη την διάρκεια του πειράματος οι διακυμάνσεις της υγρασίας και κυρίως της θερμοκρασίας καταγράφονταν (Εικ.14) αφού παίζουν σημαντικό ρόλο στον τρόπο εκδήλωσης και διαμόρφωσης των συμπτωμάτων. Από το διάγραμμα φαίνεται πώς η διακύμανση της θερμοκρασίας στην διάρκεια του πειράματος ήταν ομαλή.



Εικόνα 14: Διακύμανση της μέσης θερμοκρασίας (°C)

3.4 Δείκτης ασθένειας

Για την πιο εύκολη κατάταξη της ποικιλίας η τιμή του δείκτη ασθένειας αντιστοιχούσε σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο το οποίο χαρακτήριζε κατά πόσο η συγκεκριμένη ποικιλία είναι ευπαθής στην συγκεκριμένη απομόνωση.(Πίνακ.4)

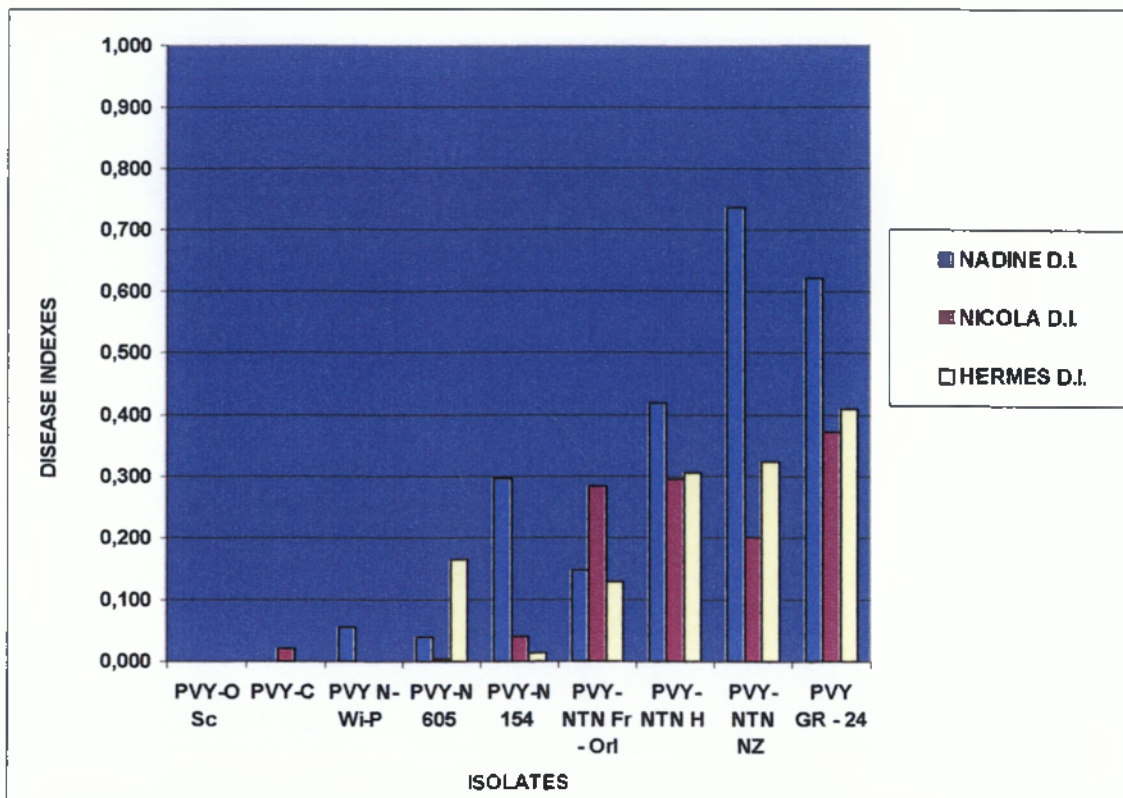
ΕΠΙΠΕΔΟ	ΔΕΙΚΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ	ΕΥΠΑΘΕΙΑ
9	0	ΚΑΘΟΛΟΥ ΕΥΠΑΘΗΣ
8	0- 0,125	ΠΟΛΥ ΛΙΓΟ ΕΥΠΑΘΗΣ
7	0,125- 0,25	ΠΟΛΥ ΛΙΓΟ ΕΥΠΑΘΗΣ
6	0,25- 0,375	ΛΙΓΟ ΕΥΠΑΘΗΣ
5	0,375- 0,50	ΛΙΓΟ ΕΥΠΑΘΗΣ
4	0,50- 0,625	ΣΧΕΤΙΚΑ ΕΥΠΑΘΗΣ
3	0,625- 0,75	ΣΧΕΤΙΚΑ ΕΥΠΑΘΗΣ
2	0,75- 0,875	ΠΟΛΥ ΕΥΠΑΘΗΣ
1	0,875 - 1	ΠΟΛΥ ΕΥΠΑΘΗΣ

Πίνακας 4: Χαρακτηρισμός των κονδύλων της κάθε ποικιλίας ανάλογα με τον δείκτη ασθένειας.

Στον παρακάτω πίνακα 5 φαίνεται η κατάταξη της κάθε ποικιλίας ανάλογα με την ευαισθησία που εμφανίζει σε κάθε απομόνωση.

Απομονώσεις του PVY	NADINE (ΕΠΙΠΕΔΟ)	HERMES (ΕΠΙΠΕΔΟ)	NICOLA (ΕΠΙΠΕΔΟ)
PVY-O Sc	9	9	9
PVY-C	9	9	8
PVY N-Wi-P	8	9	9
PVY-N 605	8	7	8
PVY-N 154	6	8	8
PVY-NTN Fr - Orl	7	7	6
PVY-NTN H	5	6	6
PVY-NTN NZ	2	6	7
PVY GR - 24	4	5	6

Πίνακας 5: Κατάταξη της κάθε ποικιλίας ανάλογα με την ευπάθεια που εμφάνισε σε κάθε απομόνωση



Εικόνα 12: Δείκτης ασθένειας για κάθε ποικιλία και απομόνωση

Από την εικόνα 12 παρατηρούμε ότι το υψηλότερο ποσοστό συμπτωματικών κονδύλων είχε η ποικιλία Nadine στην απομόνωση PVY^{NTN}-NZ και μετά να ακολουθεί η απομόνωση του PVY 24-GR. Επίσης βλέπουμε ότι στην απομόνωση PVY^N-605 έχουμε συμπτωματικούς κονδύλους στην ποικιλία Hermes. Πιο ευαίσθητη από τις ποικιλίες εμφανίζεται η Nadine μετά η Hermes και τέλος η Nicola. Η απομόνωση PVY^N-154 εμφάνισε συμπτωματικούς κονδύλους στην ποικιλία Nadine κάτι το οποίο όμως δεν συνέβαινε σε συνθήκες αγρού.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου έγινε επιτυχής η μελέτη της δυνατότητας 9 στελεχών του ιού Y της πατάτας να εμφανίσουν την ασθένεια της νεκρωτικής δακτυλιωτής κηλίδωσης των κονδύλων της πατάτας. Εφαρμόστηκε η μέθοδος IC-PCR για την ανίχνευση της εμφάνισης των διαφόρων στελεχών χαρακτήρα NTN. Οι πέντε απομονώσεις έδωσαν το χαρακτηριστικό προϊόν της PCR το οποίο βρίσκεται στο μέγεθος περίπου 835 ζευγών βάσεων. Ο υπολογισμός του δείκτη ασθένειας ήταν απαραίτητος για την δημιουργία 10 επιπέδων, από το 1 για ποικιλίες υψηλής ευπάθειας (όλοι οι κόνδυλοι παρουσιάζουν μια εκτεταμένη νέκρωση) μέχρι το 9 για ποικιλίες καθόλου ευπαθείς (καμία εμφάνιση νέκρωσης στους κονδύλους κατά την διάρκεια αποθήκευσης τους). Πιο ευπαθής ποικιλία ήταν η Nadine αφού έδωσε και τους περισσότερους συμπτωματικούς κονδύλους, ακολούθως η Hermes και τέλος η Nicola. Η απομόνωση PVY^N-154 ενώ στον αγρό δεν εμφανίζει σε καμία από τις ποικιλίες νεκρωτικά συμπτώματα στους κονδύλους, σε συνθήκες θερμοκηπίου είδαμε να εμφανίζει την ασθένεια PTNRD στην ποικιλία Nadine. Η απομόνωση PVY^N-Wip-P στον καπνό δίνει νεκρωτικά συμπτώματα, αλλά στους κονδύλους δεν εμφανίστηκε ποσοστό συμπτωματικών κονδύλων ικανό για να το κατατάξει σε απομόνωση που προκαλεί την ασθένεια PTNRD. Οι πέντε απομονώσεις οι οποίες έδωσαν στην IC-RT-PCR το χαρακτηριστικό προϊόν της NTN απομόνωσης εκδήλωσαν και στις τρεις ποικιλίες τα συμπτώματα της ασθένειας PTNRD κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. BEM, F., VARVERI, C., ELEFThERiADiS, I. and KARAFYLLiDiS, D. 1999. First report of occurrence of potato tuber necrotic ringspot disease in Greece. *Plant Dis.*, 83: 488
2. BLANCO-URGOiTi, B., TRIBOLET, M., LECLERE, S., PONZ, F., PEREZ DE SAN ROMAN, C., LEGORBURU, F.J. and KERLAN, C. 1998b. Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of The NTN, Wilga and Z isolates. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 811-819.
3. KYRiAKOPOYΛOY, 1996. Παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Διαγνωστικές μέθοδοι. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας.
4. BOONHAM, N., WALSH, K., PRESTON, S., NORTH, J., SMITH, P., BARKER, I. 2002: *Journal of Virological Methods* 102: 103-112
5. ΧΟΥΛΙΑΡΑ, Ι.Γ. 1995. Σημειώσεις Ειδικής Γεωργίας IV. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα, Σχολή Τεχνολόγων Γεωπονίας Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, :157-158.
6. DE BOKX, J.A. and HUTTINGA, H. 1981. Potato virus Y. CMI/AAB descriptions of Plant Viruses No. 242.
7. ΜΠΟΥΤΣΙΚΑ, Κ. 1993. Ενζυμο-ανοσοδοκιμή (Enzyme Linked-Immunosorbent Assay). Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο
8. LE ROMANCER, M., and NEDELLEC, M., (1997) Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). *Plant Pathol.* 46:104-111
9. ΚΑΤΤΗΣ, Ν. Ορολογικές Δοκιμές. Ταυτοποίηση ιών 4.6. Σημειώσεις από Τμήμα Γεωπονίας Α.Π.Θ.
10. ΜΠΕΜ, Φ. 1995 *Τολογικές Ασθένειες ΓΕΩΡΓΙΑ - Κτηνοτροφία* 5: 154-159.

11. ΑΥΓΕΛΗΣ, Α.Δ. ΡΟΔΙΤΑΚΗΣ, Ν. ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΑΚΗ, Γ. και ΠΑΤΕΡΑΚΗΣ, Ν. 1995. ΚΗΠΕΥΤΙΚΑ, Ίολογικά Προβλήματα της καλλιέργειας πατάτας στο οροπέδιο Λασηθίου Κρήτης ΓΕΩΡΓΙΑ - ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ 8:53-61
12. SMITH, I.M. ,DUNEZ, J., European Handbook of Plant Diseases.1997:46-47
13. ΖΑΧΟΣ, Δ.Γ. 1962. Ασθένειες των Γεωμήλων (Ίολογικές Ασθένειες) Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο:85-123
14. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ, Π., ΣΑΜΑΡΑ, Β. ΜΑΡΙΝΑΚΗΣ, Γ., ΚΑΠΑΡΟΣ, Κ., ΦΟΥΝΤΟΥΚΙΔΟΥ, Π., ΚΡΙΚΕΛΗΣ, Β., ΣΠΥΡΟΥ, Ν., και ΒΑΜΑΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, Ν. Η Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) στη διάγνωση των ιώσεων ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΙΟΛΟΓΙΑ 1996, 1(1): 83-88.
15. VARVERI, C. 2000. Potato Y potyvirus detection by immunological and molecular techniques in plants and aphids. *Phytoparasitica* 28 (2):141-148.
17. ROSNER, A. and MASLENIN, L. 1999a. Differentiating PVY^{NTN} by unique single restriction cleavage of PCR products. *Potato Res.*, 42: 215-221.
18. ΠΑΤΑΚΙΟΥΤΑΣ, Γ., 1996. Πιστοποιημένος πατατόσπορος Σποροπαραγωγή στην Ελλάδα. Εκδόσεις Γεωργική Τεχνολογία Νοέμβριος 1996: 24-25
19. VARVERI, C. and BEM, F. 2001. The NTN strain of Potato virus Y (PVY^{NTN}): a new threat for potato cultivations in Greece. *Phytopathol. Mediterr.*, 40 (2):196-197 (Abstract).
20. ΒΕΖΥΡΟΓΛΟΥ, Ν. και ΚΑΡΑΦΥΛΛΙΔΗ, Δ., 1996. Άνοσο Πολλαπλασιαστικό υλικό. Εκδόσεις Γεωργική Τεχνολογία Νοέμβριος 1996: 26-30
21. Χ.Βαρβέρη , Φ.Μπεμ. Η φυλή του ιού Y της πατάτας (PVY^{NTN}): νέος σοβαρός κίνδυνος για τις πατατοφυτείες της χώρας. 10^ο Πανελλαδικό Φυτοπαθολογικό Συνέδριο. 74
22. WEIDEMANN, H.L. and MAISS, E. 1996. Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *Zeitsch. Pflanzenkrank. Pflanzenschutz*, 103 (4): 337-345.