



**Εργαστήρια Γενικής  
Φυτοπαθολογίας**

**Φυτικοί Ιοί**

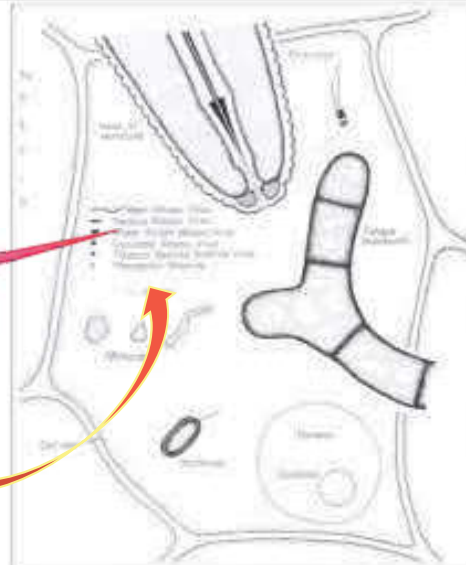



**Ε.Κ. Χατζηβασιλείου**  
Αναπλ. Καθήτρια ΓΠΑ


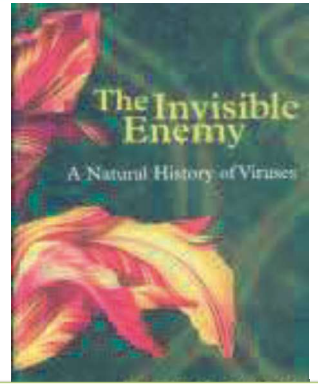
**Παθογόνα φυτών**

**«Ο αόρατος εχθρός»**

**Ιοί των φυτών**



**Τι είναι ιός;**

**Ο αόρατος εχθρός**  
*Dorothy H. Crawford*

Gifted by the Herbarium Museum, University of Cambridge.

**Ονοματολογία ιών**

**Tobacco mosaic virus (TMV)**

↓

Το όνομα του πρώτου ή του πιο κοινού ξενιστή

↓


Το πιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα

↓

**Συντομογραφία**

↓

**Ιός του μωσαϊκού του καπνού (TMV)**



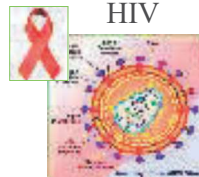
<https://plantix.net/en/library/plant-diseases/200037/tobacco-mosaic-virus>

# Τι είναι ο ιός?

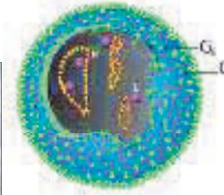
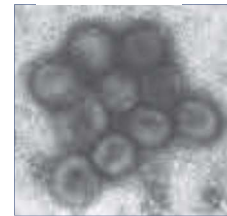


«Άσχημα νέα τυλιγμένα σε πρωτεΐνη»

Covid-19



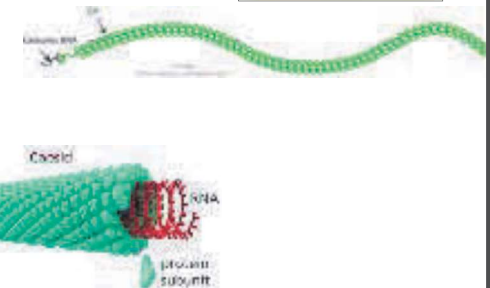
TSWV



PVY

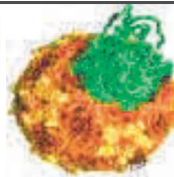


TMV



## Ιοσωμάτιο (*virion*)

Η μικρότερη δομική μονάδα του ιού



Νουκλεϊκό οξύ

Πρωτεΐνη ή  
λιποπρωτεΐνη

Γονιδίωμα,  
μολυσματικός παράγων

Καψίδιο,  
αποτελούμενο από  
καψομερή: υπομονάδες  
πρωτεΐνης

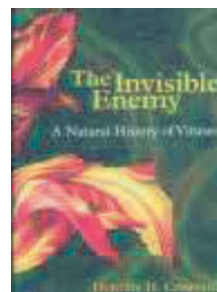
Ένζυμα, πολυαμίνες και κατιόντα και ~50% νερό

## Χαρακτηριστικά φυτικών ιών

- **Υποχρεωτικά παράσιτα**; Πολλαπλασιάζονται σε ζωντανά κύτταρα; Διασυστηματικοί στα φυτά.
- **Δεν** έχουν την οργάνωση κυττάρων.
- **Νουκλεοπρωτεΐνες** (νουκλεϊκό οξύ και πρωτεΐνη)
- Ένας τύπος ΝΟ (είτε **RNA** ή **DNA**)
- Πολλές μονάδες της ίδιας πρωτεΐνης (**υπομονάδες πρωτεΐνης**) συνιστούν το περίβλημα (**καψίδιο**).
- Μερικοί ιοί έχουν φάκελο λιποπρωτεΐνης
- Μόνο **το ΝΟ** (RNA ή DNA) απαραίτητο **για τη μόλυνση**

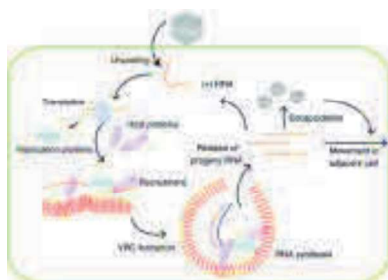


# Κύκλος «ζωής» φυτικών ιών

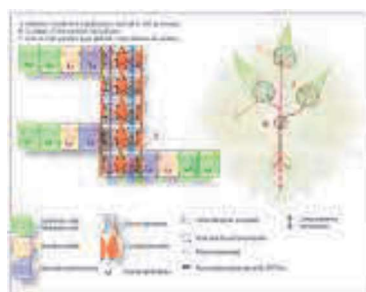


## Μέθοδοι ανίχνευσης ταυτοποίησης ιών

### Virus Life Cycle



Στο αρχικά μολυσμένο  
κύτταρο



Διακυτταρική και  
Διασυστηματική  
μετακίνηση και μόλυνση

### Ανίχνευση ιού και Διάγνωση ασθένειας

**Ανίχνευση γνωστών ιών:** εφαρμογή μιας εξειδικευμένης αξιόπιστης μεθόδου για συγκεκριμένο ιό

- **Εφαρμογή:** έλεγχοι ρουτίνας φυτικού υλικού (πχ κονδύλων πατάτας) για την παρουσία/απουσία συγκεκριμένων γνωστών ιών



**Διάγνωση ασθένειας:** εφαρμογή όλων των μεθόδων για την **αναγνώριση ιού(ών)** που εμπλέκονται **στην αιτιολογία μιας ασθένειας** (αρχές του Koch)



## Προβλήματα στη διάγνωση των ιολογικών ασθενειών

- ❑ Οι ιοί δεν είναι ορατοί με το οπτικό μικροσκόπιο
- ❑ Πολλαπλασιάζονται μόνο στον ξενιστή τους και όχι σε τεχνητό υπόστρωμα
- ❑ Τα συμπτώματά τους
  - ❑ μοιάζουν με αυτά από άλλα αίτια (αβιοτικά)
  - ❑ επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες
  - ❑ δεν φέρουν σημεία

Φυτοτοξικότητα



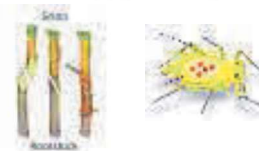
Ανάγκη εφαρμογής εξειδικευμένων εργαστηριακών μεθόδων

## Κατηγορίες εργαστηριακών μεθόδων ανίχνευσης ιών

Αυτές που στηρίζονται στην αλληλεπίδραση του ιού με το φυτό και τον φορέα (μολυσματικότητα)

Αυτές που στηρίζονται σε δομικά χαρακτηριστικά του ιού και των ισωματίων

Βιολογικός έλεγχος ή βιοδοκιμές



Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Ορολογικές δοκιμές

Μοριακές δοκιμές

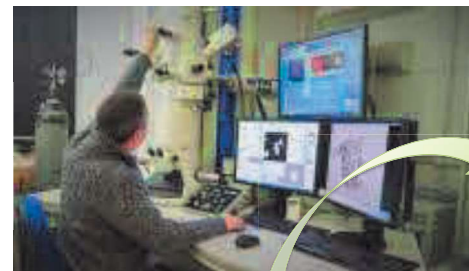


## Εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης/ανίχνευσης

- ❑ Ηλεκτρονική μικροσκοπία
- ❑ Βιολογικός έλεγχος (βιοδοκιμές)
- ❑ Ορολογικές μέθοδοι
- ❑ Μοριακές μέθοδοι



## Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



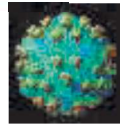
<https://www.bath.ac.uk/corporate-information/electron-microscopy/>



Γνώση μορφολογίας, μεγέθους και αρχιτεκτονικής ισωματίων



## Μέθοδοι Ανίχνευσης Ταυτοποίησης



Ιοσωμάτιο (virion)

Νουκλεϊκό οξύ

Πρωτεΐνη ή λιποπρωτεΐνη

Μοριακές δοκιμές  
ανίχνευσης

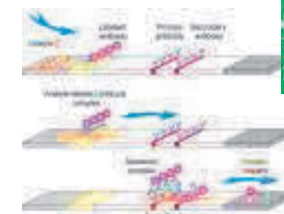
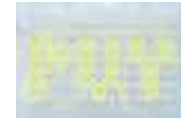
Ορολογικές δοκιμές  
ανίχνευσης

## Ανοσοενζυμικές δοκιμές



DAS- ELISA

Lateral flows

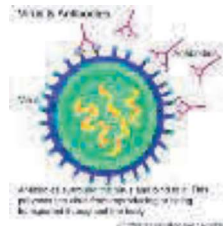


## Ορολογικές δοκιμές



Χρήση αντισωμάτων (αντιορών)  
εξειδικευμένων για την  
ανίχνευση ιικών πρωτεϊνών

Προσοχή!  
Τα φυτά δεν φτιάχνουν  
αντισώματα!



## Μοριακές δοκιμές

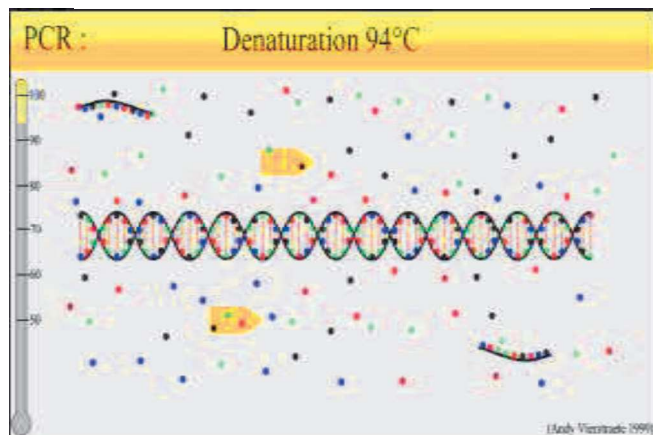
Πολλαπλασιασμός νουκλεϊκών οξέων



Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης  
(Polymerase chain Reaction, PCR)



*Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης  
(Polymerase chain Reaction, PCR)*



**Οι φυτικοί ιοί...**



Είναι υποχρεωτικά παράσιτα

Δεν έχουν την ικανότητα διάτρησης των φυτικών ιστών/κυττάρων

Δεν δημιουργούν αυτόνομες μολυσματικές μονάδες (πχ σπόρια)

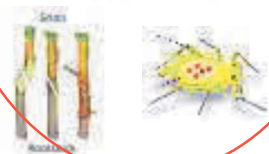
**Φορείς**

Οργανισμοί οι οποίοι, τρεφόμενοι από ασθενή φυτά, παραλαμβάνουν και μεταφέρουν τον ιό σε υγιή φυτά (πληγές)

**Κατηγορίες εργαστηριακών μεθόδων ανίχνευσης ιών**

Αυτές που στηρίζονται στην αλληλεπίδραση του ιού με το φυτό και τον φορέα (μολυσματικότητα)

**Βιολογικός έλεγχος ή βιοδοκιμές**



Αυτές που στηρίζονται σε δομικά χαρακτηριστικά του ιού και των ισοσωματίων

Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Ορολογικές δοκιμές

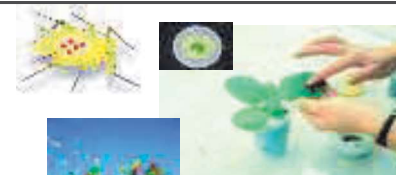
Μοριακές δοκιμές



**Βιολογικός έλεγχος (βιοδοκιμές)**

Μόλυνση **φυτοδεικτών** (φυτά - ξενιστές που αντιδρούν με συγκεκριμένα συμπτώματα σε μια ιική μόλυνση) στο εργαστήριο

- Με φυτικό εκχύλισμα
- Μετάδοση με φορέα (π.χ. αφίδες)
- Μετάδοση με εμβολιασμό



Εύρος ξενιστών  
Συμπτωματολογία  
Τρόπος μετάδοσης

Απόδειξη ότι πρόκειται για ιό ή συναφές παθογόνο



## Μηχανική μετάδοση ή μετάδοση με χυμό

Η μετάδοση ενός ιού στο εργαστήριο από ένα μολυσμένο σε ένα υγιές φυτό (**φυτοδείκτης**), με τη χρήση **εκχυλίσματος φυτικού χυμού**

### Ιοί που μεταδίδονται μηχανικά στο εργαστήριο

- ✓ Οι ιοί που μεταδίδονται με **αφίδες με μη-έμμονο τρόπο** (γένη: *Poty-*, *Cucumo-*, *Alfamo-*, *Carla-*, *Como-* κ.ά.)
- ✓ Οι **μηχανικά** μεταδιδόμενοι ιοί (*Tobamo-*, *Potex-*)

### Προσοχή!

ΔΕ ΜΕΤΑΔΙΔΟΝΤΑΙ οι έμμονοι ιοί- Εξαίρεση ο TSWV

## Παραγωγή μολύσματος - Εκχύλιση του ιού



Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,0-7,5) + προσθετικά.  
Σε χαμηλή θερμοκρασία

νεαροί ιστοί με έντονα συμπτώματα

## Μηχανική μετάδοση ή μετάδοση με χυμό

Μία διεργασία που περιλαμβάνει:

1. επιτυχή εξαγωγή του ιού από τον μολυσμένο φυτικό ιστό (προετοιμασία μολύσματος-εκχυλίσματος)
2. δημιουργία μη θανατηφόρων επιφανειακών πληγών στο φυτό
3. μεταφορά και επάλειψη του μολυσματικού χυμού στην επιφάνεια υγιών φυτών
4. είσοδος του ιού στα κύτταρα

## Μηχανική μετάδοση ή μετάδοση με χυμό

Μία διεργασία που περιλαμβάνει:

1. επιτυχή εξαγωγή του ιού από τον μολυσμένο φυτικό ιστό (προετοιμασία μολύσματος-εκχυλίσματος)
2. δημιουργία μη θανατηφόρων επιφανειακών πληγών στο φυτό
3. μεταφορά και επάλειψη του μολυσματικού χυμού στην επιφάνεια υγιών φυτών
4. είσοδος του ιού στα κύτταρα

## Γ. Είσοδος του ιού - Μόλυνση

Αδυναμία ιών να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα ενός φυτού

Δημιουργία επιφανειακών μη θανατηφόρων τραυμάτων



### Πληγωτικές ουσίες

Carborundum (silicon carbide - 300-600 mesh)  
γη των διατόμων (Celite)



## Μηχανική μετάδοση ή μετάδοση με χυμό

Μία διεργασία που περιλαμβάνει:

1. επιτυχή εξαγωγή του ιού από τον μολυσμένο φυτικό ιστό (προετοιμασία μολύσματος-εκχυλίσματος)
2. δημιουργία μη θανατηφόρων επιφανειακών πληγών στο φυτό
3. μεταφορά και επάλειψη του μολυσματικού χυμού στην επιφάνεια υγιών φυτών
4. είσοδος του ιού στα κύτταρα

### Ήλεκτρονιομικρογραφία Σάρωσης (ΗΣ)

Φυλλική επιφάνεια του *Nicotiana glutinosa* πριν (α) και μετά (β) τη μηχανική μόλυνση

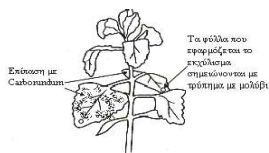


### Μηχανική μετάδοση στο εργαστήριο



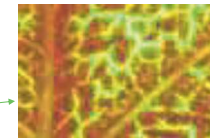


## Μηχανική μετάδοση ή μετάδοση με χυμό



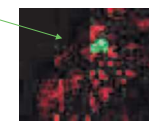
## Ανάπτυξη συμπτωμάτων από ιούς

Διασυστηματικά συμπτώματα



Μόλυνση

Τοπικά συμπτώματα



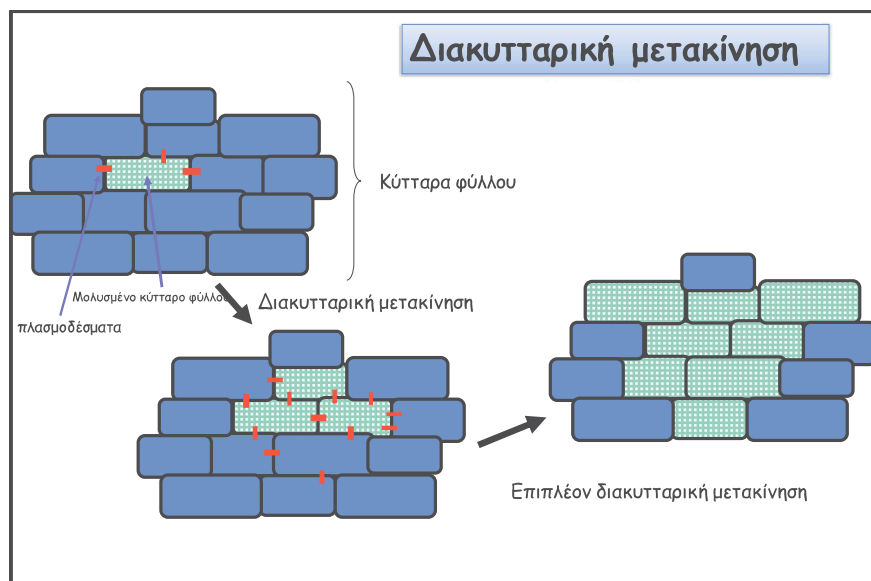
## Διαδικασία μηχανικών μολύνσεων

- Σημειώνουμε τα φύλλα που θα μολύνουμε
- Απλώνουμε ένα λεπτό στρώμα Carborundum
- Λειοτριβούμε το μολυσμένο φυτικό ιστό (1/10 ή 1/100) σε ρυθμιστικό διάλυμα
- Με καθαρά χέρια απλώνουμε μια ποσότητα μολύσματος στα φύλλα
- Μετά από μερικά λεπτά ξεπλένουμε τα φύλλα με νερό βρύσης
- Σημαίνουμε τα μολυσμένα φυτά (ημερομηνία μόλυνσης, κωδικός δείγματος)
- Πλένουμε τα χέρια μας και μεταφέρουμε τα φυτά σε θάλαμο αναπτύξεως για ανάπτυξη συμπτωμάτων.

Και τι συμβαίνει μετά τη μόλυνση.....

Σε φυτοδείκτες που μολύνονται διασυστηματικά





### Τοπικές κηλίδες σε *Chenopodium quinoa*



Μόλυνση ορισμένων κυττάρων γύρω από τα σημεία εισόδου του ιού

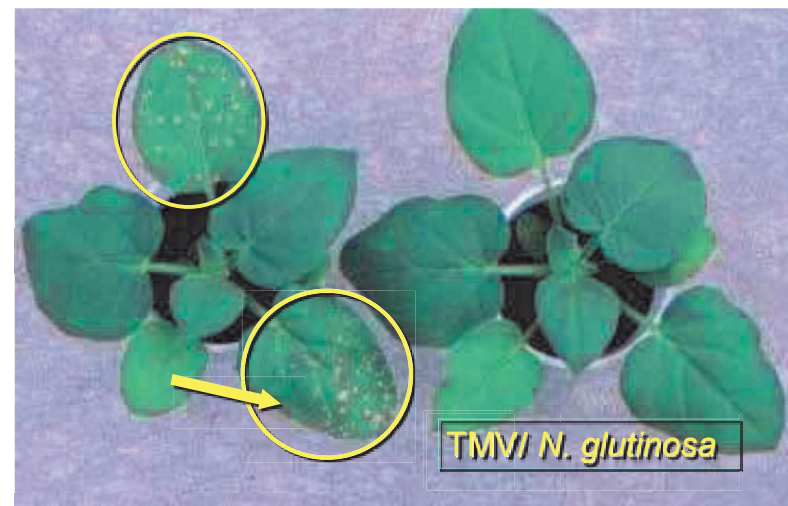
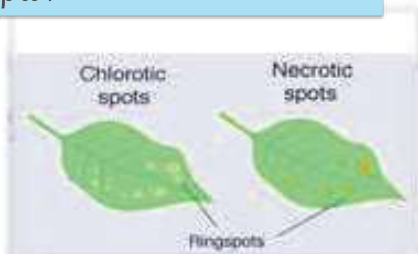
CPSV

### Ανάπτυξη συμπτωμάτων

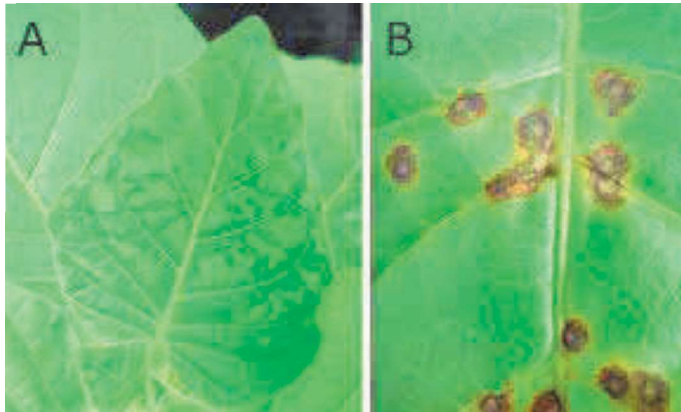
✓ **Τοπικά ή πρωτογενή συμπτώματα:** στα σημεία εισόδου του ιού.

✓ **Τοπικές κηλίδες:** μικρές εντοπισμένες περιοχές ασθενών κυττάρων

✓ Χλωρωτικές ή νεκρωτικές ή δακτυλιοειδείς κηλίδες  
Καμία οικονομική σημασία, μεγάλη διαγνωστική σημασία



Διασυστηματική και τοπική μόλυνση σε  
*N. tabacum*



Συμπτώματα  
ιολογικών ασθενειών

Εξωτερικά  
(Ιστολογικές μεταβολές)

Τοπικά συμπτώματα



Πρωτογενής μόλυνση  
(τοπικές κηλίδες &  
κηλίδες αμύλου - στα  
σημεία εισόδου του ιού)

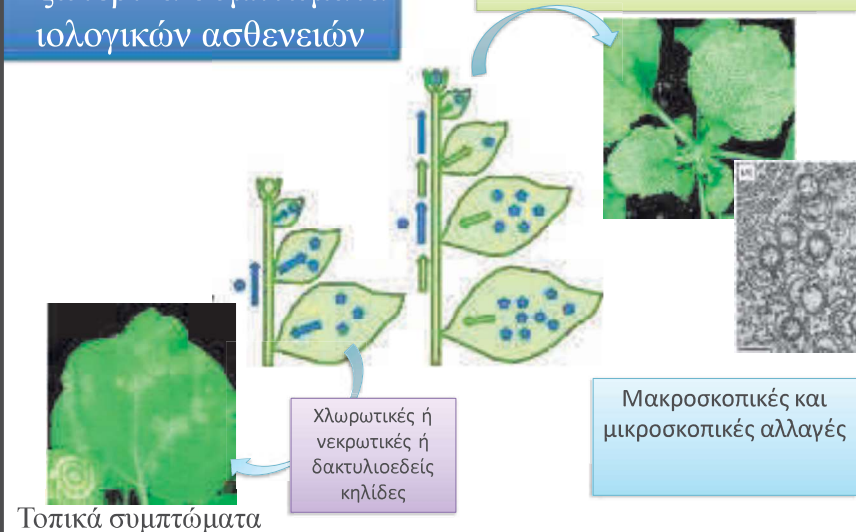
Διασυστηματικά συμπτώματα



Δευτερογενής μόλυνση  
ιστολογικές μεταβολές  
(μωσαϊκό, ποικιλοχλωρώσεις,  
ίκτηρος κλπ)

Εξωτερικά συμπτώματα  
ιολογικών ασθενειών

Διασυστηματικά συμπτώματα



Διασυστηματικά συμπτώματα  
ιώσεων

Νανισμός  
Μωσαϊκό  
Δακτυλιοειδείς κηλίδες

Ποικιλοχλώρωση  
Χλώρωση

Νεκρώσεις  
Παραμόρφωση βλαστών και φύλλων  
Γλωσσίδα ή καρκινώματα  
Διάσπαση του χρώματος των πετάλων  
Ανωμαλίες σπόρου, καρπών, γύρης

Μπορούμε να ταυτοποιήσουμε ένα ιό από τα συμπτώματα?

Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση των συμπτωμάτων

- ✓ Γενότυπος του ιού
- ✓ Γενότυπος του ξενιστή
- ✓ Ηλικία φυτού κατά τη μόλυνση
- ✓ Συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία φωτισμός, θρέψη των φυτών)

Βοηθούν στην διάγνωση

Παθογνωμονικό Σύμπτωμα



Ιός της ευλογιάς των πυρηνοκάρπων

Μηχανική μετάδοση ή μετάδοση με χυμό

Τρόπος «καλλιέργειας» των ιών στο εργαστήριο.

Βασικό «εργαλείο» ιδιαίτερα στην περίπτωση **νέων ιών** για τους οποίους δεν υπάρχουν αλλά διαγνωστικά εργαλεία.

Μοναδικός τρόπος διερεύνησης του **κύκλου (εύρους) ξενιστών ενός ιού ή μιας φυλής ενός ιού.**



## Εύρος ξενιστών ενός ιού

Η λίστα ευπαθών ξενιστών και η συμπτωματολογία

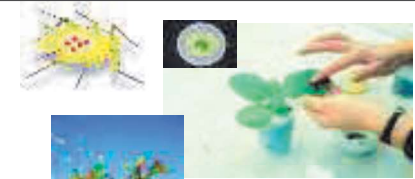


Ειδικές περιγραφές ιών (*Descriptions of Plant Viruses, Commonwealth Mycological Institute, CMI*) –

Επιλογή των κατάλληλων φυτοδεικτών



## Βιολογικός έλεγχος (βιοδοκιμές)



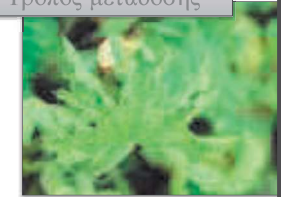
Μόλυνση φυτοδεικτών (φυτά - ξενιστές που αντιδρούν με συγκεκριμένα συμπτώματα σε μια ιική μόλυνση) στο εργαστήριο



- Με φυτικό εκχύλισμα
- Μετάδοση με φορέα (π.χ. αφίδες)
- Μετάδοση με εμβολιασμό

Εύρος ξενιστών  
Συμπτωματολογία  
Τρόπος μετάδοσης

Απόδειξη ότι πρόκειται για ιό ή συναφές παθογόνο



## Εύρος ξενιστών ενός ιού



TABLE 4. Experimental hosts susceptible to citrus latent virus (CLV) in various countries.

Host	Country	Reference
Orange	Spain	1
Orange	Spain	2
Orange	Spain	3
Orange	Spain	4
Orange	Spain	5
Orange	Spain	6
Orange	Spain	7
Orange	Spain	8
Orange	Spain	9
Orange	Spain	10
Orange	Spain	11
Orange	Spain	12
Orange	Spain	13
Orange	Spain	14
Orange	Spain	15
Orange	Spain	16
Orange	Spain	17
Orange	Spain	18
Orange	Spain	19
Orange	Spain	20
Orange	Spain	21
Orange	Spain	22
Orange	Spain	23
Orange	Spain	24
Orange	Spain	25
Orange	Spain	26
Orange	Spain	27
Orange	Spain	28
Orange	Spain	29
Orange	Spain	30
Orange	Spain	31
Orange	Spain	32
Orange	Spain	33
Orange	Spain	34
Orange	Spain	35
Orange	Spain	36
Orange	Spain	37
Orange	Spain	38
Orange	Spain	39
Orange	Spain	40
Orange	Spain	41
Orange	Spain	42
Orange	Spain	43
Orange	Spain	44
Orange	Spain	45
Orange	Spain	46
Orange	Spain	47
Orange	Spain	48
Orange	Spain	49
Orange	Spain	50
Orange	Spain	51
Orange	Spain	52
Orange	Spain	53
Orange	Spain	54
Orange	Spain	55
Orange	Spain	56
Orange	Spain	57
Orange	Spain	58
Orange	Spain	59
Orange	Spain	60
Orange	Spain	61
Orange	Spain	62
Orange	Spain	63
Orange	Spain	64
Orange	Spain	65
Orange	Spain	66
Orange	Spain	67
Orange	Spain	68
Orange	Spain	69
Orange	Spain	70
Orange	Spain	71
Orange	Spain	72
Orange	Spain	73
Orange	Spain	74
Orange	Spain	75
Orange	Spain	76
Orange	Spain	77
Orange	Spain	78
Orange	Spain	79
Orange	Spain	80
Orange	Spain	81
Orange	Spain	82
Orange	Spain	83
Orange	Spain	84
Orange	Spain	85
Orange	Spain	86
Orange	Spain	87
Orange	Spain	88
Orange	Spain	89
Orange	Spain	90
Orange	Spain	91
Orange	Spain	92
Orange	Spain	93
Orange	Spain	94
Orange	Spain	95
Orange	Spain	96
Orange	Spain	97
Orange	Spain	98
Orange	Spain	99
Orange	Spain	100

TABLE 5. Experimental hosts susceptible to Citrus latent virus (CLV) in various countries.

Host	Country	Reference
Orange	Spain	1
Orange	Spain	2
Orange	Spain	3
Orange	Spain	4
Orange	Spain	5
Orange	Spain	6
Orange	Spain	7
Orange	Spain	8
Orange	Spain	9
Orange	Spain	10
Orange	Spain	11
Orange	Spain	12
Orange	Spain	13
Orange	Spain	14
Orange	Spain	15
Orange	Spain	16
Orange	Spain	17
Orange	Spain	18
Orange	Spain	19
Orange	Spain	20
Orange	Spain	21
Orange	Spain	22
Orange	Spain	23
Orange	Spain	24
Orange	Spain	25
Orange	Spain	26
Orange	Spain	27
Orange	Spain	28
Orange	Spain	29
Orange	Spain	30
Orange	Spain	31
Orange	Spain	32
Orange	Spain	33
Orange	Spain	34
Orange	Spain	35
Orange	Spain	36
Orange	Spain	37
Orange	Spain	38
Orange	Spain	39
Orange	Spain	40
Orange	Spain	41
Orange	Spain	42
Orange	Spain	43
Orange	Spain	44
Orange	Spain	45
Orange	Spain	46
Orange	Spain	47
Orange	Spain	48
Orange	Spain	49
Orange	Spain	50
Orange	Spain	51
Orange	Spain	52
Orange	Spain	53
Orange	Spain	54
Orange	Spain	55
Orange	Spain	56
Orange	Spain	57
Orange	Spain	58
Orange	Spain	59
Orange	Spain	60
Orange	Spain	61
Orange	Spain	62
Orange	Spain	63
Orange	Spain	64
Orange	Spain	65
Orange	Spain	66
Orange	Spain	67
Orange	Spain	68
Orange	Spain	69
Orange	Spain	70
Orange	Spain	71
Orange	Spain	72
Orange	Spain	73
Orange	Spain	74
Orange	Spain	75
Orange	Spain	76
Orange	Spain	77
Orange	Spain	78
Orange	Spain	79
Orange	Spain	80
Orange	Spain	81
Orange	Spain	82
Orange	Spain	83
Orange	Spain	84
Orange	Spain	85
Orange	Spain	86
Orange	Spain	87
Orange	Spain	88
Orange	Spain	89
Orange	Spain	90
Orange	Spain	91
Orange	Spain	92
Orange	Spain	93
Orange	Spain	94
Orange	Spain	95
Orange	Spain	96
Orange	Spain	97
Orange	Spain	98
Orange	Spain	99
Orange	Spain	100

Διάγνωση και ταυτοποίηση