

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΜΩΣΑΙΚΟΥ ΤΟΥ ΜΑΡΟΥΛΙΟΥ : ΕΝΑ ΕΠΙΚΑΙΡΟ
ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ »

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ ΚΥΡΙΑΚΗ ΓΛΥΠΤΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το φθινόπωρο του 2001, σε καλλιέργεια υπαιθρίου μαρουλιού στη Δ. Κρήτη (περιοχή Χανίων), παρουσιάστηκαν συμπτώματα σε σημαντικό αριθμό φυτών, που αποδίδονται συνήθως στην παρουσία παθογόνων φυτικών ιών.

Επειδή το πρόβλημα ήταν σοβαρό και σύμφωνα με τους καλλιεργητές είχε παρουσιαστεί και τα προηγούμενα χρόνια, θεωρήθηκε χρήσιμο να πραγματοποιηθεί μια μελέτη, που θα στόχευε στην απομόνωση, χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση του ή των υπεύθυνων ιών.

Η όλη εργασία, που άρχισε από τις αρχές του 2002 και ολοκληρώθηκε μετά περίπου δέκα μήνες αποτελεί το αντικείμενο της πτυχιακής μου εργασίας. Η εργασία αυτή αποτελείται από δύο μέρη.

Το πρώτο, αναφέρεται στα ιολογικά προβλήματα της καλλιέργειας μαρουλιού, δίνοντας έμφαση στον ιό του μωσαϊκού (*Lettuce mosaic potyvirus*, LMV), καθόσον ο ιός που απομονώθηκε από τα συμπτωματικά φυτά μαρουλιού ταυτοποιήθηκε ως μια απομόνωση του LMV.

Το δεύτερο, αποτελεί την πειραματική εργασία που οδήγησε στην ταυτοποίηση του υπεύθυνου παθογόνου.

Κεφάλαιο 1

ΙΟΙ ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΥΝ ΤΟ ΜΑΡΟΥΛΙ (*Lactuca sativa*)

1. Ο ιός του κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας (*Tomato spotted wilt virus*)

Ταξινόμηση

Ο ιός ανήκει στην οικογένεια *Bunyaviridae* και στο γένος *Tospovirus*.

Εύρος ξενιστών

Ο ιός έχει ευρεία σειρά ξενιστών. Αναφέρεται σε 166 φυτικά είδη 34 οικογενειών, μεταξύ των οποίων οι 7 ανήκουν στα μονοκοτυλήδονα. Μεταδίδεται εύκολα στο εργαστήριο με μηχανική μετάδοση .

Φυσιικοί ξενιστές

Ο ιός προσβάλλει μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών. Μεταξύ αυτών, και πολλά καλλιεργούμενα, στα οποία εστιάζεται κυρίως το ενδιαφέρον μας.

Τέτοια είναι τα παρακάτω:

Capsicum annum, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum melongena* και *Solanum tuberosum*.

Συγκεκριμένα στο *Lactuca sativa*, ο ιός προκαλεί νεκρωτικές κηλίδες με παραμορφώσεις των νεαρών φύλλων, που έχουν ως αποτέλεσμα τη νέκρωση της κορυφής (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Φυτό μαρουλιού μολυσμένο από τον ιό του κηλιδωτού μαρρασμού της ντομάτας (TSWV).

Διαγνωστικά είδη-Συμπτωματολογία

➤ *Petunia hybrida* (Πετούνια)

Τοπικές νεκρωτικές κηλίδες που εμφανίζονται 2-4 ημέρες μετά τη μηχανική μετάδοση. Τα συμπτώματα δεν εμφανίζονται διασυστηματικά.

➤ *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun NN* (Καπνός), *N. clevelandii* και *N. glutinosa*

Τοπικές νεκρωτικές κηλίδες, που ακολουθούνται από διασυστηματικά νεκρωτικά γραμμικά σχέδια και παραμόρφωση των φύλλων.

➤ *Cucumis sativus* (Αγγούρι)

Οι κοτυληδόνες αναπτύσσουν τοπικά χλωρωτικά στίγματα με νεκρωτικά κέντρα 4-5 ημέρες μετά τη μηχανική μετάδοση.

Γεωγραφική διασπορά

Κοινό στις εύκρατες και υποτροπικές περιοχές ανά τον κόσμο.

Μορφολογία ιοσωματίων

Ιοσωμάτια περίπου ισομετρικά, διαμέτρου 70-90 nm, που περιβάλλονται από μεμβράνη.

Σύνθεση ιοσωματίων

Τα σωματίδια περιέχουν περίπου 20% λιπίδια, 70% πρωτεΐνες, 5% νουκλεϊκό οξύ και 5% υδρογονάνθρακες.

Το γένωμα αποτελείται από μονόκλωνο RNA, το οποίο συνίσταται από τρία τεμάχια με μέγεθος 8.897 βάσεις (L-RNA), 5.400 βάσεις και 2.916 βάσεις (S-RNA), αντίστοιχα.

Οι πρωτεΐνες του ιοσωματίου είναι τέσσερις:

Η L (120.000 MB), η G1 (78.000 MB), η G2 (58.000 MB) και η N (27.000 MB).

Μετάδοση

Μεταδίδεται με τους θρίπες *Thrips tabaci*, *T. setosus*, *T. palmi*, *Scirtothrips dorsalis*, *Frankliniella schultzei*, *F. occidentalis* και *F. fusca*. Ο ιός προσλαμβάνεται από τις προνύμφες και όχι από τα ενήλικα, όμως μεταδίδεται μόνο από τα τελευταία. Η συντομότερη περίοδος πρόσληψης που έχει αναφερθεί είναι 15 λεπτά για τον *T. tabaci*. Η λανθάνουσα περίοδος επώασης είναι 4-10 ημέρες, ανάλογα με το είδος του φορέα. Οι φορείς παραμένουν μολυσματικοί για 22-30 ημέρες μετά την πρόσληψη και μερικές φορές διατηρούν τον ιό δια βίου. Δεν μεταδίδουν τον ιό στους απογόνους τους.

Η μετάδοση δεν γίνεται με το σπόρο ή με τη γύρη.

2. Ο ιός του δυτικού ίκτερου των τεύτλων (*Beet western yellows virus*)

Ταξινόμηση

Ο ιός ανήκει στην οικογένεια *Luteoviridae* και στο γένος *Luteovirus*.

Εύρος ξενιστών

Η σειρά ξενιστών είναι ευρεία, πάνω από 100 είδη από 21 οικογένειες δικοτυλήδων είναι ευαίσθητα στις διάφορες φυλές του ιού. Εμφανίζεται σε κοινά είδη ζιζανίων και διαχειμάζει στους ξενιστές των αφίδων φορέων. Μεταδίδεται διαμέσου των αφίδων αλλά όχι με μηχανική μετάδοση με το χυμό. Τα πιο κοινά συμπτώματα που προκαλεί είναι κίτρινος μεταχρωματισμός μεταξύ των νεύρων στα παλαιότερα και ενδιάμεσα φύλλα, κυρίως υπό συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού.

Φυσικοί ξενιστές

Ο ιός προσβάλλει πολλά καλλιεργούμενα φυτικά είδη, στα οποία εστιάζεται κυρίως το ενδιαφέρον μας. Τέτοια είναι, τα παρακάτω:

Spinacia oleraceae, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Brassica napo-brassica*, *B. oleraceae var botrytis*, *Raphanus sativus*, *Citrullus lanatus*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Pisum sativum* και *Vicia faba*.

Συγκεκριμένα στο *Lactuca sativa* προκαλεί την εκδήλωση συμπτωμάτων ίκτερου.

Διαγνωστικά είδη-Συμπτωματολογία

➤ *Capsella bursa-pastoris* (Αγριοκαρδαμούδα)

Σοβαρές χλωρώσεις και μέτριο καρούλιασα φύλλων, λέππυνση και θρυμματισμός. Το κιτρίνισμα αναπτύσσεται ακροπεταλικά. Σε μερικούς βιότυπους του είδους, παρατηρούνται και ερυθρωποί μεταχρωματισμοί συνοδευτικά της χλώρωσης.

➤ *Senecio vulgaris* (Μαρτιάκος)

Πορφυρός χρωματισμός στο περιθώριο των ώριμων φύλλων.

Γεωγραφική διασπορά

Έχει αναφερθεί στην Β. Αμερική, στην Ευρώπη και στην Ασία, προφανώς είναι κοινό ανά τον κόσμο.

Μορφολογία ιοσωματίων

Τα ιοσωμάτια είναι ισομετρικά, διαμέτρου περίπου 26 nm.

Σύνθεση ιοσωματίων

Ο ιός αποτελείται από νουκλεϊκό οξύ σε ποσοστό 30% και 70% από πρωτεΐνη.

Το γένωμα αποτελείται από μονόκλωνο RNA, με μέγεθος 5.641 βάσεις. Οι πρωτεΐνες των ιοσωματιων είναι δυο. Η μεγαλύτερη με MB 56.000 και η μικρότερη με MB 24.000.

Μετάδοση

Μεταδίδεται με αρκετά είδη αφίδων, όπως τα *Aphis craccivora*, *A. gossypii* και *Acythosiphon solani*, με σημαντικότερο το *Myzus persicae*, της οικογένειας *Aphididae*. Η μετάδοση γίνεται με έμμονο τρόπο και ο ιός παραμένει στον φορέα για περισσότερο από 50 ημέρες. Οι φορείς διατηρούν την ικανότητα μετάδοσης μετά την έκδυση, αλλά ο ιός δεν μεταδίδεται στους απογόνους.

Δεν μεταδίδεται μηχανικά, με εμβολιασμό, με επαφή μεταξύ φυτών, με σπόρο αλλά ούτε και με τη γύρη.

3. Ο ιός του νεκρωτικού ίκτερου του μαρουλιού (*Lettuce necrotic yellows virus*)

Ταξινόμηση

Ο ιός ανήκει στην οικογένεια *Rhabdoviridae* και στο γένος *Cytorhabdovirus*.

Εύρος ξενιστών

Ο ιός έχει μικρό αριθμό ξενιστών που ανήκουν στις οικογένειες *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Leguminosae*, *Liliaceae* και *Solanaceae*. Η μηχανική μετάδοση με μολυσμένο χυμό είναι σχετικά δύσκολη στο μαρούλι, αλλά εύκολη σε ορισμένα *Nicotiana*.

Φυσικοί ξενιστές

Ο ιός προσβάλλει τα ακόλουθα φυτικά είδη:

Datura stramonium, *Nicotiana glutinosa* και *Lactuca sativa*.

Στο τελευταίο, προκαλεί συμπτώματα ίκτερου, με νεκρώσεις και νανισμό.

Διαγνωστικά είδη-Συμπτωματολογία

➤ *Datura stramonium* (Τάτουλας)

Ασθενής χλώρωση μεταξύ των νεύρων στα νέα φύλλα.

➤ *Nicotiana clevelandii*

Προκαλεί μωσαϊκό και νανισμό.

➤ *Nicotiana glutinosa*

Οι ήπιες απομονώσεις προκαλούν νανισμό και συστροφή των φύλλων προς τα κάτω, καθώς και ελαφρύ μωσαϊκό στα νέα φύλλα. Οι μολυσματικές απομονώσεις προκαλούν τοπικές νεκρωτικές κηλίδες 6-8 ημέρες μετά από μηχανική μετάδοση και διασυστηματικά συμπτώματα με κιτρίνισμα των νεύρων. Ακολουθεί χλώρωση, καρούλιασα των φύλλων και ανακοπή της ανάπτυξης των φύλλων της κορυφής.

Γεωγραφική διασπορά

Είναι ευρέως διαδεδομένο στην Αυστραλία, ενώ έχει αναφερθεί και στην Νέα Ζηλανδία.

Μορφολογία ιοσωματίων

Τα ιοσωμάτια είναι ραβδόμορφα. Το τυπικό τους μήκος είναι περίπου 227-360 nm και το πλάτος τους 52- 66nm.

Σύνθεση ιοσωματίων

Το γένωμα αποτελείται από RNA μονής αλυσίδας και το μεγαλύτερο κομμάτι του έχει μέγεθος 12.540 βάσεις.

Οι πρωτεΐνες του ιοσωματίου είναι πέντε:

Η L (180.000-190.000 MB), η G (76.000 MB), η N (54.000 MB), η NS (38.000 MB) και η M (19.000 MB).

Μετάδοση

Η μετάδοση γίνεται με την αφίδα *Hyperomyzus lactucae* με έμμονο τρόπο. Ο ιός δεν μεταδίδεται με το σπόρο.

4. Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (*Cucumber mosaic virus*)

Ταξινόμηση

Ο ιός ανήκει στην οικογένεια *Bromoviridae* και στο γένος *Cucumovirus*.

Εύρος ξενιστών

Ιδιαίτερα ευρεία σειρά ξενιστών. Έχουν αναφερθεί 191 ευαίσθητα είδη 40 οικογενειών. Μεταδίδεται μηχανικά διαμέσου του μολυσμένου χυμού και προκαλεί συμπτώματα εξαρτώμενα από την φυλή του ιού και την ποικιλία του ξενιστή.

Φυσικοί ξενιστές

Ο ιός προσβάλλει τα ακόλουθα φυτικά είδη :

Cucumis sativus και γενικότερα τα κολοκυνθώδη, *Lycopersicon esculentum*, *Spinacia oleraceae* και *Lactuca sativa*.

Στο τελευταίο, προκαλεί συμπτώματα μωσαϊκού και παραμορφώσεις.

Διαγνωστικά είδη-Συμπτωματολογία

- *Chenopodium amaranticolor* και *C. quinoa* (Χηνοπόδιο κόκκινο και λευκό)
Χλωρωτικές ή νεκρωτικές τοπικές κηλίδες αλλά όχι διασυστηματική προσβολή.

- *Cucumis sativus* (Αγγούρι)
Διασυστηματικό μωσαϊκό και νανισμός.

- *Cucurbita moschata* (Κολοκύθι)
Διασυστηματικό μωσαϊκό και νανισμός.

- *Lycopersicon esculentum* (Ντομάτα)
Μωσαϊκό με περιορισμό του ελάσματος που προκαλεί τα χαρακτηριστικά συμπτώματα φύλλου φτέρης.

➤ *Nicotiana glutinosa*

Τα συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με την φυλή του ιού και κυμαίνονται από ελαφρύ μέχρι έντονο μωσαϊκό. Μερικές φυλές προκαλούν κιτρίνισμα των νεύρων και μωσαϊκό.

➤ *Vigna unguiculata* (Βίνια)

Μικρές καφέ κηλίδες στα μηχανικά μολυσμένα εμβολιασμένα φύλλα. Μερικές φυλές προσβάλλουν το φυτό διασυστηματικά και προκαλούν ήπιο μωσαϊκό.

Γεωγραφική διασπορά

Ο ιός συναντάται παγκοσμίως κυρίως στις εύκρατες περιοχές.

Μορφολογία ιοσωματίων

Τα ιοσωμάτια είναι ισοδιαμετρικά, με διάμετρο περίπου 28-30nm.

Σύνθεση ιοσωματίων

Τα ιοσωμάτια αποτελούνται από 18% νουκλεϊκό οξύ και από 82% πρωτεΐνη. Το γένωμα αποτελείται από RNA μονής αλυσίδας και αποτελείται από τρία κομμάτια. Το μεγαλύτερο έχει μέγεθος 3.389 βάσεις, το επόμενο 3.035 βάσεις και το τρίτο 2.197 βάσεις

Μετάδοση

Μεταδίδεται με μη έμμονο τρόπο από περισσότερα από 60 είδη αφίδων. Κυριότερος φορέας είναι η *Myzus persicae*.

Η μετάδοση είναι δυνατή και διαμέσου του σπόρου. Συμβαίνει σε διαφορετικό ποσοστό σε 19 είδη, ανάμεσα τους και πολλά ζιζάνια. Η διασπορά και η διατήρηση μέσω των ζιζανίων είναι σημαντική στην επιδημιολογία του ιού.

5. Ο ιός των μεγάλων νεύρων του μαρουλιού (*Lettuce big vein virus*)

Ταξινόμηση

Ο ιός ανήκει στο γένος *Varicosavirus*, αλλά δεν έχει ακόμα ενταχθεί σε οικογένεια.

Εύρος ξενιστών

Εμφανίζονται 3-9 οικογένειες ευαίσθητες στον ιό. Τα φυτά που μολύνονται στο εργαστήριο εμφανίζονται κυρίως χλωρωτικά ή με λευκές νευρώσεις στα φύλλα.

Φυσικοί ξενιστές

Ο ιός προσβάλλει τα ακόλουθα φυτικά είδη:

Sonchus asper, *Sonchus oleraceus* και *Lactuca sativa*.

Στο τελευταίο προκαλεί διόγκωση των νεύρων με παραμορφώσεις στα φύλλα.

Διαγνωστικά είδη-Συμπτωματολογία

➤ *Lactuca sativa* (Μαρούλι)

Χλωρωτικός ή λευκός αποχρωματισμός των περινεύριων περιοχών του φύλλου.

➤ *Sonchus oleraceus* (Ζωχός)

Τα φυτά δεν παρουσιάζουν συμπτώματα ή παρουσιάζουν ελαφρά διόγκωση των νεύρων.

➤ *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* (Χηνοπόδιο κόκκινο και λευκό).

Εμφανίζονται νεκρωτικές, χλωρωτικές κηλίδες.

➤ *Nicotiana occidentalis*

Τοπικές, χλωρωτικές κηλίδες και διασυστηματική χλώρωση.

Γεωγραφική διασπορά

Ο ιός είναι συναντάται ευρέως στην Αυστραλία, στην Β. Αμερική, στην Ιαπωνία αλλά και σε πολλές χώρες της Ευρώπης.

Μορφολογία ιοσωματίων

Τα ιοσωμάτια είναι ραβδοειδή, με τυπικό μήκος 320-360nm και πλάτος 18nm.

Σύνθεση ιοσωματίων

Το γένωμα αποτελείται από RNA διπλής αλυσίδας, γραμμικό, που αποτελείται από δύο κομμάτια. Το μεγαλύτερο έχει μέγεθος 14.000 βάσεις, ενώ το δεύτερο 13.000 βάσεις.

Η πρωτεΐνη έχει MB 48000.

Μετάδοση

Μεταδίδεται με ένα φορέα, το μύκητα *Ospidium brassicae* της τάξης *Chytridiales*. Δεν μεταδίδεται με αφίδες, με επαφή των φυτών, με το σπόρο ή με τη γύρη, αλλά μόνο με μηχανική μετάδοση και εμβολιασμό.

6. Ο ιός του μολυσματικού ίκτερου του μαρουλιού (*Lettuce infectious yellows virus*)

Ταξινόμηση

Ο ιός ανήκει στην οικογένεια *Closteroviridae* και στο γένος *Closterovirus*.

Εύρος ξενιστών

Έχουν αναφερθεί περισσότερες από 9 οικογένειες ευαίσθητες στον ιό. Συγκεκριμένα 45 είδη από 15 οικογένειες παρουσίασαν συμπτώματα μετά την προσβολή από τον ιό.

Φυσιικοί ξενιστές

Ο ιός προσβάλλει φυτικά είδη όπως τα παρακάτω:

Beta vulgaris, *Citrulus lanatus*, *Cucumis melo*, *Cucurbita pepo*, *C. maxima*, *C. moschata*, *Daucus carota* και *Lactuca sativa*. Στο τελευταίο, προκαλεί συμπτώματα ίκτερου.

Διαγνωστικά είδη-Συμπτωματολογία

Στα ακόλουθα φυτικά είδη παρατηρήθηκε προσβολή από τον ιό, που εκδηλώθηκε με συμπτώματα όπως: σοβαρή χλώρωση και/ή ρόδιος μεταχρωματισμός, συστροφή, έντονος αποχρωματισμός των νεύρων καθώς και νανισμός.

- *Beta vulgaris* (Παντζάρι)
- *Chenopodium quinoa* (Χηνοπόδιο λευκό)
- *Lactuca sativa* (Μαρούλι)
- *Brassica pekinensis*
- *Citrulus lanatus* (Καρπούζι)
- *Cucumis melo* (Πεπόνι)
- *Cucumis sativus* (Αγγούρι)
- *Trifolium subterraneum*
- *Malva parviflora* (Μολόχα)
- *Nicotiana clevelandii*

Γεωγραφική διασπορά

Ο ιός είναι διαδομένος στις Η.Π.Α., κυρίως στην Καλιφόρνια και την Αριζόνα.

Μορφολογία ιοσωματίων

Τα ιοσωμάτια είναι νηματοειδή, συνήθως εύκαμπτα, μήκους 1800-2000nm και πλάτους 13-14 nm.

Σύνθεση ιοσωματίων

Το γένωμα αποτελείται από RNA μονής αλυσίδας.

Μετάδοση

Μεταδίδεται με ένα έντομο της οικογένειας *Aleyrodidae*, το *Bemisia tabaci*. Η μετάδοση γίνεται με ημι-έμμονο τρόπο. Ο ιός δεν πολλαπλασιάζεται στον φορέα.

Δεν μεταδίδεται μηχανικά.

7. Ο ιός του ψευδο-ίκτηρου των τεύτλων (*Beet pseudo-yellows virus*)

Ταξινόμηση

Ο ιός ανήκει στην οικογένεια *Closteroviridae* και στο γένος *Closterovirus*.

Εύρος ξενιστών

Περισσότερα από 9 είδη των *Cucumis* είναι ευαίσθητα στον ιό. Τα φυτά που μολύνονται μηχανικά στο εργαστήριο παρουσιάζουν χλώρωση, ρόδινο μεταχρωματισμό και συστροφή.

Φυσιικοί ξενιστές

Ο ιός προσβάλλει τα φυτικά είδη :

Beta vulgaris, *Capsella bursa-pastoris*, *Cichorium endivi*, *Taraxacum officinalis*, *Conium maculatum* και *Lactuca sativa*, όπου προκαλεί συμπτώματα ίκτηρου.

Διαγνωστικά είδη-Συμπτωματολογία

- Στα φυτικά είδη *Beta vulgaris*, *Capsella bursa-pastoris* και *Lactuca sativa* εμφανίζεται κιτρίνισμα, αδυναμία και διαύγεια των φύλλων.
- Στα φυτικά είδη *Taraxacum officinale* και *Chenopodium capitatum* εμφανίζεται εσωτερικός ρόδινος μεταχρωματισμός των νεύρων και χλώρωση.
- Στα φυτικά είδη *Linum unitatissimum*, *Nicotiana glutinosa* και *Cucumis melo* εμφανίζεται εσωτερικό κιτρίνισμα των νεύρων.

Γεωγραφική διασπορά

Ο ιός είναι διαδεδομένος στην Αυστραλία (Ταζμανία), την Γαλλία, την Ιαπωνία, την Ολλανδία και τις Η.Π.Α. (Καλιφόρνια).

Μορφολογία ιοσωματίων

Πιθανότατα τα ιοσωμάτια είναι εύκαμπτα, με μήκος 1000nm.

Σύνθεση ιοσωματίων

Άγνωστη.

Μετάδοση

Μεταδίδεται με φορέα ένα έντομο της οικογένειας *Aleyrodidae*, τον *Trialeurodes vaporariorum*. Η μετάδοση γίνεται με ημι-έμμονο τρόπο.

Ο ιός δεν πολλαπλασιάζεται στον φορέα, δεν μεταδίδεται στους απογόνους, δεν μεταδίδεται με την επαφή μεταξύ των φυτών αλλά ούτε και με το σπόρο.

Κεφάλαιο 2

Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΜΩΣΑΪΚΟΥ ΤΟΥ ΜΑΡΟΥΛΙΟΥ

Πολυάριθμες ασθένειες επηρεάζουν την καλλιέργεια μαρουλιού και περίπου δεκαπέντε από αυτές προκαλούνται από ιούς. Ανάμεσα στις τελευταίες, ο ιός του μωσαϊκού του μαρουλιού (*Lettuce mosaic virus*, LMV) και ο ιός του κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), είναι οι πιο ζημιογόνοι.

Ο LMV είναι ενδεχομένως ο πιο καταστρεπτικός ιός, καθώς μεταδίδεται διαμέσου του σπόρου και επίσης με τις αφίδες με μη έμμονο τρόπο και μπορεί να προκαλέσει γενικά ασθένειες με μορφή επιδημίας.

Η εξάπλωση του σήμερα είναι ραγδαία λόγω των αυξανόμενων διεθνών συναλλαγών, ενώ η αντιμετώπιση του είναι εφικτή μόνο σε ορισμένες χώρες όπου έχουν ληφθεί προληπτικά μέτρα.

1. Ανακάλυψη και ονοματολογία

Ο ιός του μωσαϊκού στο μαρούλι αναφέρθηκε για πρώτη φορά στη Φλόριντα των ΗΠΑ από τον Jagger (1921), λίγο αργότερα από τον Brandenburg (1928) στη Γερμανία και τον Ogilvie (1928) στις Βερμούδες .

Αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε καλλιέργεια θερμοκηπίου από τον Ainsworth (1937) στην Αγγλία.

Ο Newhall (1923) ήταν ο πρώτος που ανακάλυψε την μετάδοσή του, με σπόρο του μαρουλιού.

Από τις αρχές του 1950 ο LMV θεωρείται ο σημαντικότερος ιός που προσβάλλει το μαρούλι στην Ευρώπη και την Καλιφόρνια.

2. Γεωγραφική κατανομή και οικονομική σημασία

Ο LMV έχει σήμερα παγκόσμια διάδοση και επικρατεί ως το κυριότερο παθογόνο σε όλες τις περιοχές που καλλιεργούνται μαρούλια ανά τον κόσμο. Το γεγονός αυτό ευνοείται από την παγκόσμια κυκλοφορία των σπόρων του, εδώ και πολλά χρόνια.

Ο ιός προσβάλλει κυρίως τις υπαίθριες καλλιέργειες. Προκαλεί όμως σημαντικές απώλειες και στις πρώιμες χειμερινές καλλιέργειες θερμοκηπίου, όταν τα σπορόφυτα δεν έχουν αναπτυχθεί κάτω από εντομοπροστατευτικές συνθήκες και επομένως έχουν εκτεθεί σε προσβολή από ιοφόρες αφίδες.

Τα συμπτώματα (μειωμένη ανάπτυξη, αδυναμία σχηματισμού “καρδιάς” και μερικές φορές νέκρωση και/ή κιτρίνισμα) είναι υπεύθυνα για τις απώλειες στην παραγωγή, εξαιτίας των μη αποδεκτών εμπορικών χαρακτηριστικών που προσδίδουν στους καρπούς. Το μέγεθος των απωλειών είναι άμεσα συνδεδεμένο με τη χρήση, ή όχι, πιστοποιημένου σπόρου, καθώς επίσης και με τις καλλιεργητικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγική διαδικασία.

3. Ξενοιστές

Ο ιός ανήκει στην οικογένεια Potyviridae και στο γένος Potyvirus.

Όπως οι περισσότεροι ιοί του γένους αυτού, ο LMV έχει μια μέσου μεγέθους σειρά φυσικών ξενοιστών. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί προσβολή σε 24 είδη εννέα οικογενειών (Πίνακας I).

ΠΙΝΑΚΑΣ I. Φυσικοί ξενοιστές του ιού του μωσαϊκού του μαρουλιού (LMV). (Εικόνες 2 ,3 ,4, 5 και 6).

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΕΙΔΟΣ	ΚΟΙΝΟ ΟΝΟΜΑ
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Stellaria media</i>	Στελλαρία η μέση
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium album</i>	Λουβουδιά
	<i>Spinacia oleracea</i>	Σπανάκι
<i>Compositae</i>	<i>Carduus broteroi</i>	Γαϊδουράγκαθο ή Κάρδος
	<i>Carthamus tinctorius</i>	Ατρακτυλίδα
	<i>Cichorium endivia</i>	Ραδίκι

	<i>Helminthia (Picris) echioides</i>	Χοιρομουρίδα
	<i>Lactuca sativa</i>	Μαρούλι
	<i>L. serriola</i>	Αγριομάρουλο
	<i>L. virosa</i>	Αγριομάρουλο
	<i>Senecio vulgaris</i>	Μαρτιάκος
	<i>Sonchus asper</i>	Τραχύς ζωχός
	<i>Zinnia elegans</i>	Ζιννία
<i>Cruciferae</i>	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Αγριοκαρδαμούδα ή Καφέλλα
<i>Geraniaceae</i>	<i>Erodium cicutarium</i>	Βελανιδιά
<i>Labiatae</i>	<i>Lamium amplexicaule</i>	Δωδεκάνθι
<i>Leguminosae</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Ρεβίθι
	<i>Lathyrus odoratus</i>	Λαθούρι
	<i>Pisum sativum</i>	Αρακάς ή Μπιζέλι
<i>Malvaceae</i>	<i>Malva parviflora</i>	Μολόχα
<i>Primulaceae</i>	<i>Anagallis arvensis</i>	Φελλόχορτο ή Αναγαλλίδα



Εικόνα 2. Φυτά του *H. echioides*, φυσικού ξενιστή του LMV.



Εικόνα 3. Φυτά ρεβιθιού μολυσμένα από τον LMV.



Εικόνα 4. Φυσική μόλυνση με LMV στο *Cicer arietinum*.



Εικόνα 5. Ο LMV στον αρακά.



Εικόνα 6. *Zinnia elegans* με συμπτώματα μωσαϊκού οφειλόμενα στον LMV.

4. Συμπτώματα

Όπως στις περισσότερες ασθένειες που προκαλούνται από ιούς του γένους *Ροτύνιγυς*, τα συμπτώματα διαφοροποιούνται σημαντικά, ανάλογα με το γονότυπο του φυτού, την φυλή του ιού, το χρόνο προσβολής (πρώιμα-όψιμα) και τις περιβαλλοντολογικές συνθήκες.

Στα ώριμα κεφαλωτά μαρούλια εμφανίζεται νανισμός, παραμόρφωση κεφαλής, στίξεις, παραμόρφωση και κιτρίνισμα των φύλλων (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Μαρούλι ποικιλίας *Romana*, μολυσμένο με τον LMV.

Μερικές φορές ανάλογα με την ποικιλία του φυτού και την φυλή του ιού, είναι δυνατό να εμφανιστούν νεκρωτικές ή χλωρωτικές κηλίδες (Εικόνες 8 και 9) καθώς και μη φυσιολογικοί μεταχρωματισμοί -θαμπό χρώμα και μωσαϊκό - (Εικόνα 10) στα φύλλα. Στα νεύρα παρατηρούνται συχνά νεκρώσεις ή αποχρωματισμός (Εικόνα 11). Τα συμπτώματα αυτά είναι λιγότερο εμφανή σε ποικιλίες που περιέχουν τη χρωστική ανθοκυανίνη .



Εικόνα 8. Νεκρώσεις οφειλόμενες στην παρουσία του LMV σε σπορόφυτα μαρουλιού.



Εικόνα 9. Νεκρώσεις και ποικιλόχρωση σε φύλλο μαρουλιού ποικιλίας *Romana*, εξαιτίας της προσβολής από τον LMV.



Εικόνα 10. Επίπτωση της μόλυνσης του LMV σε σπορόφυτα μαρουλιού.



Εικόνα 11. Φύλλα μαρουλιού ποικιλίας *Romana* με αποχρωματισμό στα νεύρα.

Όταν προσβληθούν νεαρά φυτά, τα εσωτερικά φύλλα παραμένουν κατσαρωμένα και τα φυτά αδυνατούν να σχηματίσουν “καρδιά” (Εικόνα 12). Οι ανθικές καταβολές είναι κατά πολύ κοντύτερες και λιγότερο διακλαδιζόμενες και έτσι η ποσότητα του παραγόμενου σπόρου παρουσιάζεται αισθητά μειωμένη.



Εικόνα 12. Συμπτώματα μωσαϊκού σε νεαρό σπορόφυτα μαρουλιού.

Πολύ μολυσματικές φυλές αναφέρεται να προκαλούν έντονη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και μερικές φορές ακόμη και νέκρωση των ευαίσθητων ποικιλιών (Εικόνα 13).

Στις ανθεκτικές ποικιλίες, τα συμπτώματα που προκαλεί η κοινή φυλή του LMV ποικίλουν από το φυσιολογικό μέχρι ελαφρές κηλιδώσεις ή ξεσπόριασμα, ανάλογα με τη γενετική σύσταση της ποικιλίας, καθώς και με το αν φέρουν την *mo1*¹ ή *mo1*² πηγή ανθεκτικότητας.



Εικόνα 13. Νεκρωτικά συμπτώματα (δεξιά) σε μολυσμένο από τον LMV μαρούλι, σε αντίθεση με υγίες φυτό (αριστερά).

5. Μετάδοση

A. Μετάδοση με το σπόρο

Ο ιός είναι σπορομεταδιδόμενος στο μαρούλι και αυτό εξαρτάται από το χρόνο της προσβολής του μητρικού φυτού, την ποικιλία και τις κλιματικές συνθήκες.

Ο ρυθμός μετάδοσης είναι αισθητά μειωμένος όταν τα φυτά είναι ζωηρά, ενώ χαμηλές θερμοκρασίες ημέρας συμβάλλουν στην αύξηση του ποσοστού μόλυνσης. Ο ρυθμός κυμαίνεται από 1 έως 12% στους ευαίσθητους γονότυπους, ενώ οι ανθεκτικοί δεν μεταδίδουν την κοινή φυλή ή τη μεταδίδουν σε πολύ χαμηλό ποσοστό. Φυλές που υπερνικούν το γονίδιο *mo1*¹, αναφέρονται ως μη σπορομεταδιδόμενες.

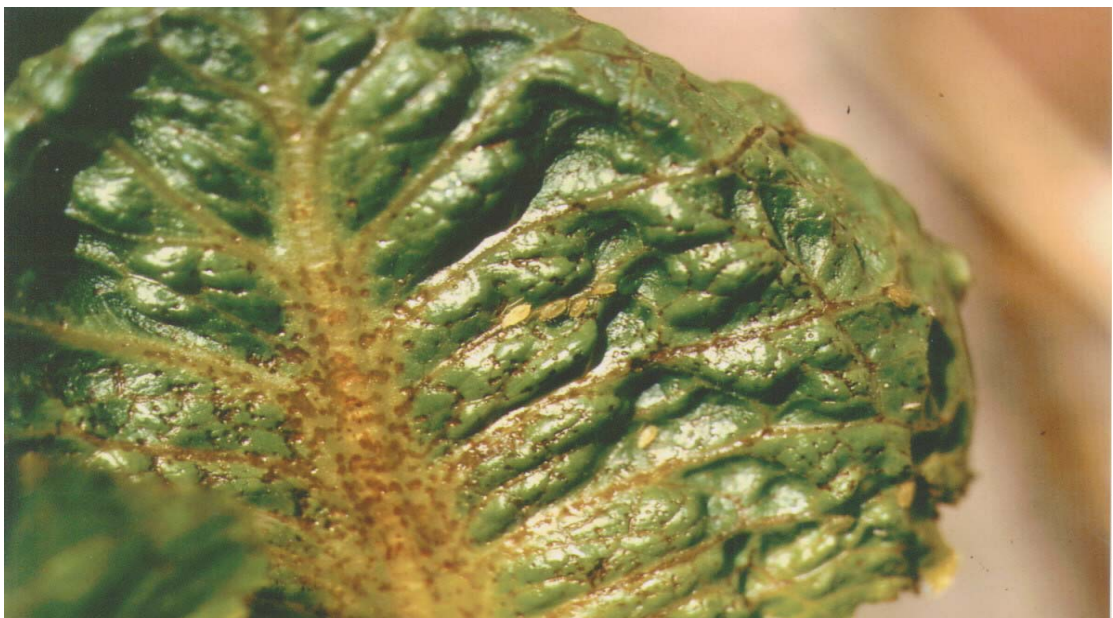
Η μετάδοση στους σπόρους του μαρουλιού μπορεί να γίνει με τη γύρη, τα ωάρια των μολυσμένων φυτών, αλλά και με μηχανική μετάδοση. Ο ιός εισβάλλει στο έμβρυο, στις κυτταρικές μεμβράνες, στο ενδοσπέρμιο καθώς και στο περικάρπιο αλλά σε μικρότερο ποσοστό.

B. Μετάδοση με τις αφίδες

Ομοίως με τους περισσότερους ιούς του γένους Potyvirus, ο LMV μεταδίδεται με μη έμμονο τρόπο, από αρκετά είδη αφίδων (Εικόνα 14). Αποτελεσματικοί φορείς είναι τα είδη *Myzus persicae* (Εικόνα 15), *Macrosiphum euphorbiae*, *Acyrtosiphon scariolae* και *Aphis gossypii* της οικογένειας Aphididae.



Εικόνα 14. Αποικία αφίδων στο αυτοφύες *Euphorbia* spp.



Εικόνα 15. Φύλλο μαρουλιού με έντονες νεκρώσεις στα νεύρα. Το φύλλο είναι αποικισμένο από την αφίδα *Myzus persicae*.

6. Διάδοση

Αρχική πηγή μόλυσματος στο χωράφι αποτελούν κυρίως οι μολυσμένοι με τον ιό σπόροι. Το ποσοστό προσβολής των φυτών είναι άμεσα συνδεδεμένο με το ποσοστό μόλυνσης των σπόρων. Έντονες εξάρσεις της ασθένειας παρατηρήθηκαν όταν οι σπορομερίδες ήταν προσβλημένες σε επίπεδα 1% και πάνω.

Ο ιός εξαπλώνεται από τα μολυσμένα σπορόφυτα σε γειτονικά υγιή φυτά και σε ευαίσθητα ζιζάνια διαμέσου των αφίδων φορέων. Η ταχύτητα της διάδοσης σχετίζεται με τον αριθμό και την ενεργητικότητα των αφίδων. Έτσι η λεκάνη της *B. Μεσόγειου* είναι πολύ ευνοϊκή για επιδημίες λόγω του υψηλού πληθυσμού ενεργών φορέων.

Εάν το μέγεθος της καλλιέργειας είναι μικρό, ο ρόλος των παρακείμενων προσβεβλημένων καλλιεργειών ή ζιζανίων μπορεί να είναι καθοριστικός.

Το αυτοφυές *Helminthia echioides* έχει μεγάλη επιδημιολογική σημασία αφού διαιωνίζει τον ιό και επιπλέον οι απομονώσεις από αυτό το φυτικό ξενιστή είναι πολύ μολυσματικές (Εικόνα 2).

7. Φυλές

Τρεις φυλές (1, 2 και 3) απομονώθηκαν αρχικά, από την ποικιλία *Parris Island Cos* του μαρουλιού στην Καλιφόρνια από τους McLean & Kinsey (1962;1963). Η διαφοροποίηση έγινε με βάση τον διαφορετικό τρόπο εκδήλωσης των συμπτωμάτων και την ευαισθησία των υπό μελέτη ποικιλιών μαρουλιού και αρακά. Από αυτές η 1 είχε τα πιο έντονα συμπτώματα.

Αργότερα απομονώθηκε η φυλή 4 από το *Chenopodium album* (McLean & Kinsey, 1963), η οποία έδωσε εντονότερα συμπτώματα και από τις τρεις προηγούμενες (συντομότερος "θάνατος" του φυτού στις περισσότερες ποικιλίες μαρουλιού).

Μια φυλή που απομονώθηκε από το αυτοφυές *Helminthia echioides* ονομάστηκε LMV-L επειδή ήταν θανατηφόρος για μερικές ποικιλίες, ενώ σε άλλες προκάλεσε μόνο σοβαρή παραμόρφωση φύλλων και νεκρώσεις. Η φυλή δεν αποδείχθηκε να είναι σπορομεταδιδόμενη.

Αργότερα έγινε δοκιμαστικά ομαδοποίηση σε 3 φυλετικές ομάδες με βάση τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονοτύπων. Η πρώτη ομάδα ποικιλιών μαρουλιού, που δεν περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας, είναι ευαίσθητη σε όλους τους παθότυπους του ιού. Η επόμενη, περιλαμβάνει ποικιλίες μεταξύ των οποίων και μερικές που φέρουν δυο γνωστά γονίδια ανθεκτικότητας $mo1^1$ και $mo1^2$. Η ομάδα προσβάλλεται μόνο από ορισμένους παθότυπους του ιού. Τα φυτά με το $mo1^1$ ή $mo1^2$ γονίδιο δεν αποφεύγουν τη διασυστηματική προσβολή, αλλά τα συμπτώματα είναι ήπια ή αμελητέας επίπτωσης. Η ανάπτυξη του φυτού επηρεάζεται ελαφρώς και το μεγαλύτερο ποσοστό των φυτών ξεφεύγει της προσβολής. Τέλος η τρίτη ομάδα ποικιλιών, που φέρει το $Mo2$, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, είναι ανθεκτική μόνο στον παθότυπο I.

Σήμερα υπάρχουν ποικιλίες μαρουλιού που έχουν τα τρία γνωστά γονίδια ανθεκτικότητας : $mo1^1$, $mo1^2$ και $Mo2$. Όμως υπάρχουν απομονώσεις του ιού που δεν αντιμετωπίζονται (Πίνακας II):

Πίνακας II. Αντίδραση των παθότυπων του ιού για τους διάφορους γονότυπους.

ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΠΑΘΟΤΥΠΟΣ			
	I	II	III	IV
----	E	E	E	E
$mo1^1$	A	A	E	E
$mo1^2$	A	A	A	E
$Mo2$	A	E	E	E

Όπου : **A**: Ανθεκτικό

E : Ευπαθές

---: Χωρίς ανθεκτικότητα

8. Φυσικο-χημικές ιδιότητες και δομή

Τα σωματίδια είναι νηματοειδή (Εικόνα 16) με μέσο μέγεθος περίπου 750×13 nm (Tomlinson ,1964). Το μοριακό βάρος της καψιδιακής πρωτεΐνης είναι 34 k D. Το RNA είναι μονής αλυσίδας.



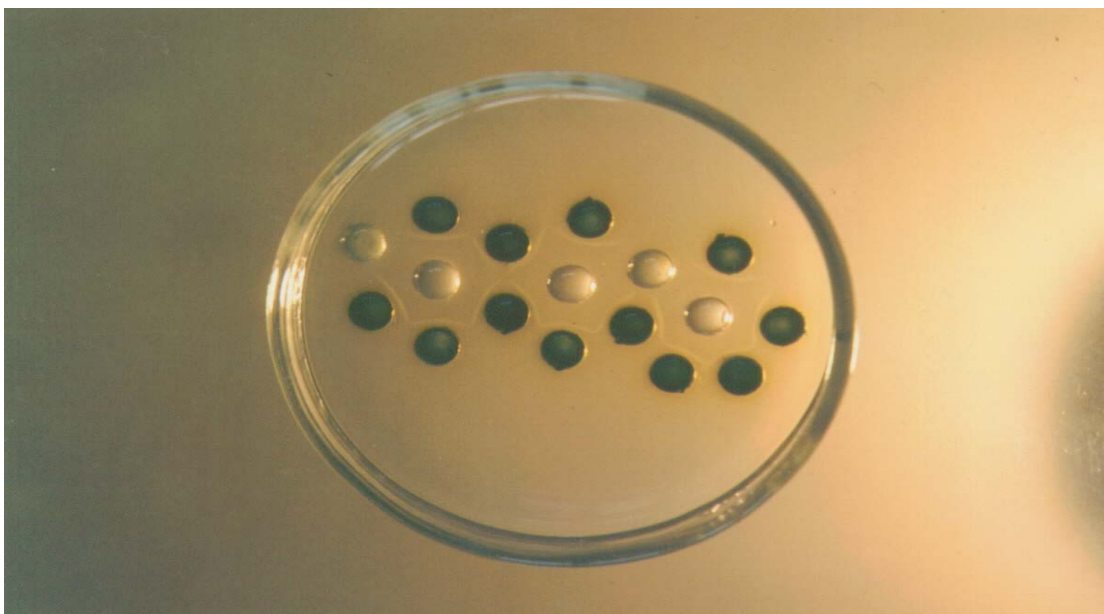
Εικόνα 16. Νηματοειδή σωματίδια του ιού (LMV).

9. Ανάπτυξη μεθόδων για ταυτοποίηση και ανίχνευση (ορολογικές τεχνικές)

Οι πρώτοι αντιοροί έναντι του LMV, δημιουργήθηκαν από τον Tomlinson (1964) και χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε τεστ ανοσοδιάχυσης. Αργότερα βελτιωμένες μέθοδοι κάθαρσης των ιών του γένους Potyvirus, οδήγησαν στην δημιουργία καλύτερων αντιορών .

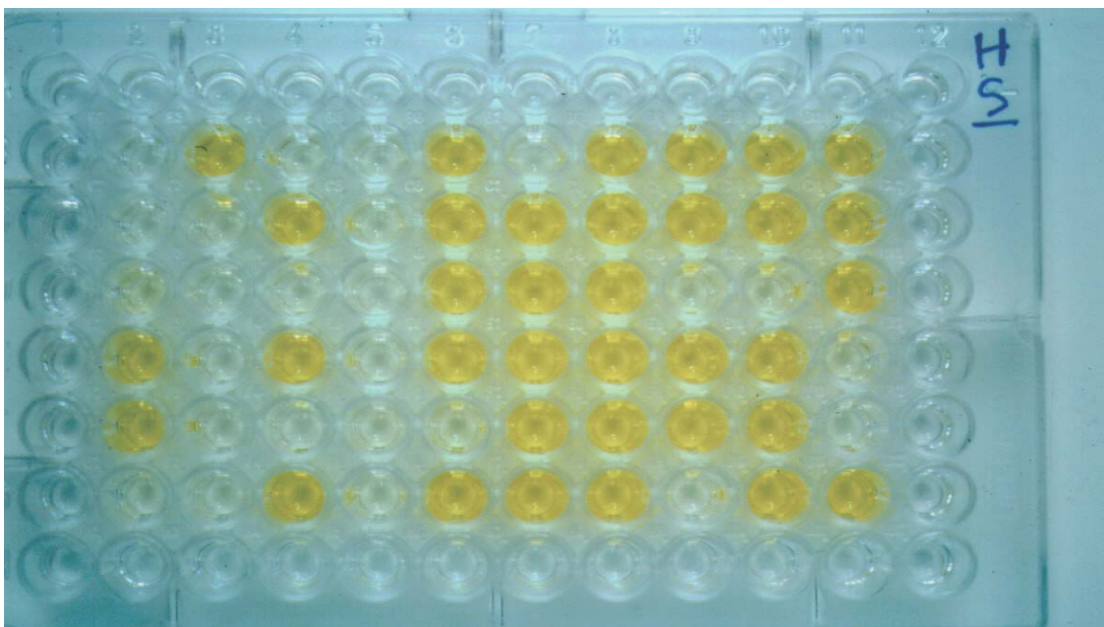
Σήμερα χρησιμοποιούνται διάφορες ορολογικές μέθοδοι. Μια από αυτές, αυτή της ανοσοδιάχυσης πηκτού άγαρ σε ένα μέσο που περιέχει 0,1 % θειικό δωδεκακυκλικό θείο (SDS) επιτρέπει την ανίχνευση του LMV στο μαρούλι (Εικόνα 17). Η μέθοδος είναι γρήγορη, φτηνή, πρακτική, όμως κρίνεται τελικά ακατάλληλη

για τεστ μεγάλης κλίμακας λόγω μειωμένης ευαισθησίας και μη οικονομικής χρήσης της.



Εικόνα 17. Τρυβλίο Petri στη δοκιμή της ανοσοδιάχυσης έναντι αντιορού του LMV.

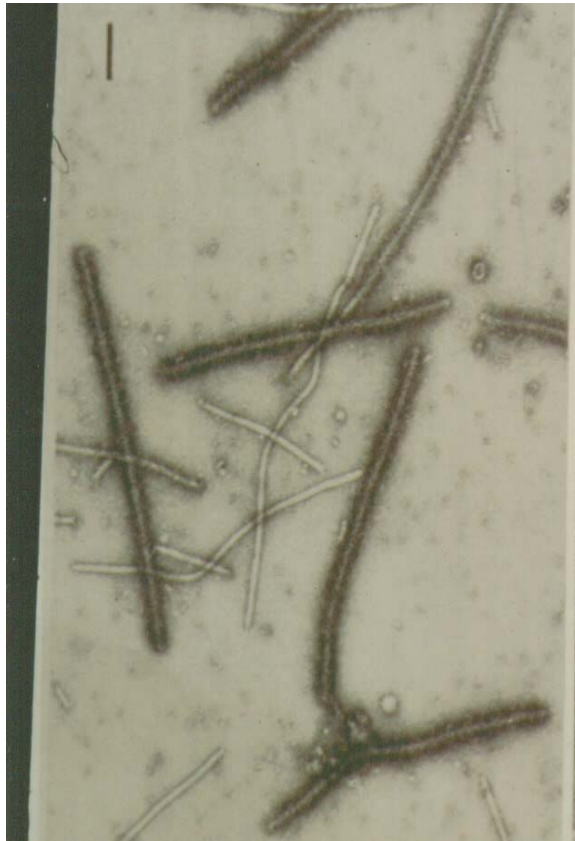
Από τη δεκαετία του 70 εφαρμόζεται η ενζυμική ανοσοπροσοροφητική δοκιμή (ELISA) για τον εντοπισμό του LMV, ιδιαίτερα για δείγματα σπόρων. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μορφή της δοκιμής ELISA για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών είναι η τεχνική του διπλού σάντουιτς (DAS-ELISA) (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Πλάκα της δοκιμής DAS-ELISA στο τελευταίο στάδιο (οι κυψελίδες με το κίτρινο χρώμα περιέχουν δείγμα μολυσμένο με τον LMV).

Για πολύ καιρό οι έλεγχοι για την ύπαρξη του ιού του μωσαϊκού στο μαρούλι γίνονταν βιολογικά. Όμως με την ανάπτυξη του τεστ ELISA το οποίο είναι ευαίσθητο, αξιόπιστο, γρήγορο και φθινό, τα βιολογικά τεστ εγκαταλείφθηκαν ήδη από το 1985. Το τεστ μπορεί να ανιχνεύσει τον ιό σε 1 σπόρο ανάμεσα σε 30.000, δηλαδή στο επίπεδο ανοχής 0,3 ‰ που ισχύει για τις ΗΠΑ .

Για τον ιό του LMV χρησιμοποιήθηκαν επίσης ανοσο-απορροφητικές ηλεκτρονικές τεχνικές (ISEM) που πραγματοποιούνται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο της “παγίδευσης” ή της “στεφάνωσης”, αποδείχθηκε ότι είναι δυνατόν να εντοπισθεί ο LMV σε ένα μολυσμένο σπόρο ανάμεσα σε 100 υγιείς (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τη δοκιμή της “στεφάνωσης” (παρατηρούνται ιοσωμάτια περιτριγυρισμένα με ανοσοσφαιρίδια του LMV)

10. Αντιμετώπιση

Πολυάριθμες προσπάθειες έγιναν για την εξυγίανση του σπόρου από προσβλημένα μητρικά φυτά, αλλά τελικά αποδείχθηκαν μη ρεαλιστικές από άποψη πρακτικότητας, κόστους και αποτελεσματικότητας. Μια από αυτές, η θερμοθεραπεία με την επίδραση ξηρού αέρα ή εμβάπτιση σε ζεστό νερό εμποδίζει αισθητά τη βλαστικότητα του σπόρου, χωρίς όμως να αποδομεί πλήρως τον ιό.

Έτσι οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν στη δημιουργία των καλύτερων δυνατών συνθηκών για την παραγωγή υγιούς σπόρου, καθώς μόνο έτσι μπορεί πλέον να τεθεί υπό έλεγχο ευκολότερα ο ιός. Σήμερα κρίνεται αναγκαία η χρήση πιστοποιημένου σπόρου. Όταν οι παραγωγοί δεν είναι υποχρεωμένοι ή ενημερωμένοι σχετικά με την ανάγκη χρήσης του και ιδιαίτερα όταν καλλιεργούνται σχετικά μικρές εκτάσεις, είναι δυνατόν να ξεσπάσουν σοβαρές επιδημίες. Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα συχνό στις εύκρατες και Μεσογειακές χώρες όπου οι πληθυσμοί των αφίδων φορέων είναι πολύ μεγάλοι.

Με βάση τα δεδομένα αυτά, σε ορισμένες χώρες όπως στις Η.Π.Α. (Καλιφόρνια, Φλόριντα) καθώς και πολλές ευρωπαϊκές χώρες τέθηκαν όρια ανοχής της παρουσίας του ιού ώστε να αποφευχθούν επιδημίες (0,1% στην Ευρώπη και 0,3‰ στις ΗΠΑ).

Επιτακτικής όμως σημασίας είναι και η ανάπτυξη αξιόπιστων και πρακτικών καλλιεργητικών τεχνικών που εξασφαλίζουν την κατάσταση φυτουγείας του σπόρου.

Με βάση αυτές, προβλέπεται η εγκατάσταση της καλλιέργειας σε περιοχές μη ευνοϊκές για τους πληθυσμούς αφίδων, καθώς και σε μια λογική απόσταση από τις εμπορικές καλλιέργειες. Επίσης η χρήση φυτικών βιολογικών 'φρακτών' από καλαμπόκι ανάμεσα στις σειρές μαρουλιού, η έναρξη της καλλιέργειας με πιστοποιημένο σπόρο, η χρήση αφιδοκτόνων και ο αποτελεσματικός έλεγχος των ζιζάνιων.

Στην Δ. Ευρώπη σήμερα οι περισσότερες καλλιέργειες για την παραγωγή σπόρου, τουλάχιστον για εμπορική χρήση, καλλιεργούνται σε θερμοκήπια στα οποία έχουν ληφθεί μέτρα εντομοπροστασίας (εντομοστεγή δίκτυα).

Σημαντική είναι τέλος και η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών, για να εξασφαλίσουμε τον καλύτερο δυνατό έλεγχο του ιού. Σήμερα σε ορισμένες χώρες

όπως π.χ. στην Γαλλία και σε μικρότερη έκταση στην Αγγλία, Γερμανία, Ισπανία και Ιταλία, η προοδευτική χρήση πολυάριθμων ανθεκτικών ποικιλιών έχει μειώσει αισθητά τις απώλειες. Στις ΗΠΑ μόνο το 10% της παραγωγής μαρουλιών παράγεται από ανθεκτικές ποικιλίες, ενώ η ποικιλιακή παραλλακτικότητα είναι ακόμα πολύ περιορισμένη.

Ανθεκτικότητα στον ιό αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Αργεντινή, σε μια χειμερινή ποικιλία μαρουλιού. Αποδείχθηκε ότι η ανθεκτικότητα σχετιζόταν με την μη μετάδοση του ιού και κληρονομούνταν ως ένα υπολειπόμενο γονίδιο $mo1^1$. Παρόμοια ανθεκτικότητα βρέθηκε και σε 3 Αιγυπτιακές ποικιλίες άγριου μαρουλιού και το υπολειπόμενο γονίδιο ονομάστηκε $mo1^2$. Τα τεστ συγγένειας αλληλομορφίας απέδειξαν ότι τα δυο γονίδια ήταν αλληλόμορφα.

Το επίπεδο ανθεκτικότητας σε μια κοινή σειρά, που διαθέτει το υπολειπόμενο γονίδιο, εξαρτάται από το γονότυπο της ποικιλίας και πιθανώς από την επίδραση του περιβάλλοντος. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα γονίδια $mo1^1$ και $mo1^2$ είναι διαφορετικοί αλληλόμορφοι πολύ στενά συνδεδεμένων γονιδίων.

Μια μελέτη για τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις ποικιλίες που περιέχουν τις δυο πηγές ανθεκτικότητας απέδειξε ότι το $mo1^2$ γονίδιο παρέχει σχεδόν ανοσία σε μερικές απομονώσεις, ενώ αντιθέτως το $mo1^1$ είναι λιγότερο αποτελεσματικό. Επειδή όμως η ύπαρξη του πρώτου, προσδίδει ανθεκτικότητα σε πιο ευρεία σειρά απομονώσεων, έχει ήδη γίνει η εισαγωγή του σε πολλές ποικιλίες. Απομένει να διερευνηθεί η πιθανότητα συνύπαρξης και των δυο γονιδίων στην ίδια ποικιλία.

Η ανακάλυψη μιας καινούργιας μορφής ανθεκτικότητας στην ποικιλία "Ιθάκη" που κληρονομείται από ένα μόνο κυρίαρχο γονίδιο $Mo2$ προσφέρει μια άλλη ευκαιρία να συνυπάρξουν διαφορετικοί δυνατοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας.

Άλλες πηγές ανθεκτικότητας έχουν βρεθεί σε διάφορα άγρια είδη μαρουλιού, και κυρίως στο *Lactuca virosa* το οποίο παρουσιάζει ανοσία σε όλους τους παθότυπους που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα. Η γενετική βάση της ανθεκτικότητας διερευνάται, ενώ γίνονται προσπάθειες να εισαχθεί ανθεκτικότητα στο *L. sativa* διαμέσου του υβριδισμού.

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

Στην περιοχή των Χανίων, το φθινόπωρο του 2001, αναφέρθηκε προσβολή οφειλόμενη σε παθογόνους ιούς, σε υπαίθρια καλλιέργεια μαρουλιού ποικιλίας *Parris Island Cos.* Ορισμένα δείγματα φυτών της καλλιέργειας, μεταφέρθηκαν στο εργαστηριακό θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Φυτικής Ιολογίας, ΕΘΙΑΓΕ Ηρακλείου, με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση του υπεύθυνου ιού. Αποδείχθηκε, ότι επρόκειτο για μια απομόνωση του ιού του μωσαϊκού του μαρουλιού (*Lettuce mosaic virus*), που στην εργασία αυτή θα αναφέρεται ως LMV- Χα.

Ο ιός μεταδόθηκε μηχανικά (μέθοδος που περιγράφεται παρακάτω), και διατηρήθηκε σε φυτά *C. quinoa*, ενώ τρία από τα μολυσμένα φυτά μαρουλιού μεταφυτεύτηκαν σε μεγάλες γλάστρες, με σκοπό την παραγωγή σπόρων. Όλα τα φυτά παρέμειναν στο εργαστηριακό θερμοκήπιο, υπό ρυθμιζόμενες συνθήκες θερμοκρασίας ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) και υγρασίας (περίπου 70%).

2. ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Η ικανότητα μηχανικής μετάδοσης του LMV- Χα, ελέγχθηκε μέσα από μια σειρά δοκιμών σε φυτοδείκτες από διάφορες βοτανικές οικογένειες όπως: *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Curcubitaceae*, *Graminaceae*, *Fabaceae* και *Solanaceae*.

Η βλάστηση των φυτοδεικτών έγινε σε σπορεία με οργανοχουμικό υπόστρωμα DEGA. Ακολούθησε μεταφύτευση σε πλαστικά γλαστράκια, που περιείχαν μίγμα απολυμασμένου χώματος, τύρφης και άμμου (3:1:1) στο οποίο είχε γίνει κατάλληλη λίπανση. Οι φυτοδείκτες αναπτύχθηκαν κάτω από ρυθμιζόμενες συνθήκες θερμοκηπίου μέχρι και την εμφάνιση του τέταρτου ή πέμπτου φύλλου, όπου και χρησιμοποιήθηκαν.

Ως μολύσματα, χρησιμοποιήθηκαν τα φύλλα της κορυφής από τα μολυσμένα φυτά του φυτοδείκτη *C. quinoa*, στον οποίο όπως αναφέραμε είχε διατηρηθεί ο ιός. Τα φύλλα ομογενοποιήθηκαν σε απολυμασμένο γουδί πορσελάνης παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$) 0,1M με pH 7,3, σε αναλογία 1gr/5ml.

Κατά την τεχνική της μηχανικής μετάδοσης, οι φυτοδείκτες σκονίστηκαν με γη διατόμων (celite) για τη δημιουργία μικροπληγών και στη συνέχεια έγινε η μόλυνση, με επάλειψη όλων των φύλλων τους με το ομογενοποιημένο δείγμα, με τη βοήθεια βαμβακοφόρου. Ακολούθησε ξέπλυμα με άφθονο νερό, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του χυμού στα φύλλα, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα δημιουργίας τοξικότητας λόγω οξειδωσης του χυμού.

Οι μολυσμένοι φυτοδείκτες, παρέμειναν σε συνθήκες θερμοκηπίου, υπό καθημερινή παρατήρηση μέχρι και 20-25 ημέρες, για την καταγραφή των συμπτωμάτων, που παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα III.

Πίνακας III. Εύρος ξενιστών και συμπτωματολογικές αντιδράσεις.

ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	
	Τοπικά	Διασυστηματικά
Gramineae		
<i>Zea mays</i>	-	-
<i>Avena sativa</i>	-	-
<i>Triticum durum</i>	-	-
Fabaceae		
<i>Vicia faba cv. Aqua Dolce</i>	-	-
<i>Lupinus albus</i>	-	-
<i>Phaseolus vulgaris cv. Bountiful</i>	-	-
<i>Phaseolus aureus</i>	-	-
<i>Vigna sinensis</i>	-	-
<i>Pisum sativum cv. Karina</i>	-	Mot
<i>Pisum sativum cv. Puget</i>	-	Mot
<i>Pisum sativum cv. Rondo</i>	-	Mot
Solanaceae		
<i>Datura metel</i>	-	-
<i>Nicotiana rustica</i>	-	-
<i>Nicotiana tabacum cv. Xanthi nc</i>	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-
<i>Nicotiana tabacum cv. Samsun</i>	-	-
<i>Nicotiana cavicola</i>	-	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	-
<i>Lycopersicon esculentum cv. Belladonna</i>	-	-
<i>Petunia hybrida</i>	-	-
<i>Solanum nigrum</i>	-	-
Cucurbitaceae		
<i>Cucumis melo</i>	-	-
<i>Cucurbita pepo</i>	-	-
<i>Cucumis sativus</i>	-	-

Compositae		
<i>Calendula officinalis</i>	-	-
<i>Zinnia elegans</i>	-	-
<i>Lactuca sativa cv. Gramsi</i>	-	-
<i>Lactuca sativa cv. Nora Blond</i>	-	-
<i>Lactuca sativa cv. Lollo Rossa</i>	-	-
<i>Lactuca sativa cv. Parris Island</i>	-	-
<i>Lactuca sativa cv. Parris Island Cos</i>	-	-
<i>Lactuca sativa cv. Santa Anna</i>	-	-
<i>Lactuca sativa cv. Regina dei Ghiacci</i>	-	-
<i>Lactuca sativa cv. Romana</i>	-	-
<i>Lactuca sativa cv. Grenada</i>	-	-
Caryophyllaceae		
<i>Dianthus barbatus</i>	-	-
Amaranthaceae		
<i>Gomphrena globosa</i>	-	-
Chenopodiaceae		
<i>Spinacia oleracea cv. Viroflay</i>	-	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LLN	Mot
<i>Chenopodium quinoa</i>	LLN	Mot

LLN: τοπικές νεκρωτικές κηλίδες

Mot: ποικιλοχλωρωση

-: δεν μολύνθηκε

Οι επιπλέον δοκιμές μηχανικής μετάδοσης που έγιναν στο φυτοδείκτη *C. quinoa*, για τον έλεγχο πιθανής λανθάνουσας μόλυνσης, δεν έδωσαν κανένα διαφορετικό αποτέλεσμα. Συνεπώς, ο LMV- Χα δεν είναι ιδιαίτερα πολυφάγος, αφού προσβάλλει πολύ περιορισμένο εύρος ξενιστών.

Όπως φαίνεται, από τα 42 είδη 8 οικογενειών που δοκιμάστηκαν, εκδηλώθηκαν συμπτώματα μόνο σε 3 φυτικά είδη από 2 οικογένειες. Συγκεκριμένα, στο *Pisum sativum* (αρακάς) της οικογένειας *Fabaceae*, σε τρεις ποικιλίες (*Karina*, *Puget* και *Rondo*) εμφανίστηκαν συμπτώματα ποικιλοχλώρωσης (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Ποικιλοχλώρωση σε φύλλο του *Pisum sativum* cv. *Rondo*, οφειλόμενη σε μόλυνση από τον LMV-Χα.

Εντονότερα ήταν τα συμπτώματα που εμφανίστηκαν σε δυο είδη της οικογένειας *Chenopodiaceae*, τα *C. quinoa* και *C. amaranticolor*. Εδώ παρατηρήθηκε ποικιλοχλώρωση σε συνδυασμό με τοπικές νεκρωτικές κηλίδες (Εικόνες 21 και 22).



Εικόνα 21. Τοπικές κηλίδες σε φύλλο του φυτοδείκτη *Chenopodium amaranticolor*.



Εικόνα 22. Διασυστηματικά συμπτώματα του LMV στο φυτοδείκτη *Chenopodium quinoa*.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΑΡΟΥΛΙΟΥ

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ευπάθεια στον LMV- Χα των καλλιεργούμενων ποικιλιών μαρουλιού στην Κρήτη, συλλέχθηκαν οι εννέα επικρατέστερες ποικιλίες εμπορίου (Πίνακας III).

Ορισμένος αριθμός σπόρων από κάθε ποικιλία, φυτεύτηκε αρχικά σε σπορείο και στη συνέχεια ακολούθησε μεταφύτευση σε πλαστικά γλαστράκια (η διαδικασία περιγράφεται στο υποκεφάλαιο των ξενιστών). Δέκα με δεκαπέντε μέρες μετά τη φύτευση, δηλαδή κατά την έκπτυξη του τέταρτου με πέμπτου φύλλου, γινόταν η μηχανική μετάδοση με τον τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως. Περίπου δεκαπέντε με εικοσιπέντε μέρες αργότερα, ακολουθούσε μακροσκοπικός έλεγχος, για να προσδιοριστεί η συχνότητα εμφάνισης συμπτωμάτων μωσαϊκού στα φυτά.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας IV), παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης των συμπτωματολογικών αντιδράσεων των υπό μελέτη ποικιλιών μαρουλιού.

Πίνακας IV. Συμπτωματολογικές αντιδράσεις (μωσαϊκό) ποικιλιών μαρουλιού.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΩΝ	% ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΩΝ
<i>Gramsi</i>	0/30	0
<i>Nora Blond</i>	2/30	6,67
<i>Lollo Rossa</i>	3/35	8,57
<i>Parris Island</i>	0/20	0
<i>Parris Island Cos</i>	2/30	6,67
<i>Santa Anna</i>	0/30	0
<i>Regina dei Ghiacci</i>	5/40	12,5
<i>Romana</i>	2/35	5,71
<i>Grenada</i>	2/35	5,71

Παρατηρούμε ότι τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης συμπτωμάτων μωσαϊκού (12,5%) παρουσίασε η ποικιλία *Regina dei Ghiacci* (Εικόνα 21). Η αμέσως μικρότερη συχνότητα (8,57%) εμφανίστηκε στην ποικιλία *Lollo Rossa*. Οι ποικιλίες *Nora Blond*, *Parris Island Cos* και *Romana*, *Grenada* εμφάνισαν συμπτώματα μωσαϊκού με σχεδόν τη μισή συχνότητα από της δυο προηγούμενες,

δηλαδή 6,67% και 5,71% αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες τρεις ποικιλίες που μελετήθηκαν (*Gramsi*, *Parris Island* και *Santa Anna*) δεν εμφάνισαν συμπτώματα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι η ποικιλία *Romana*, η περισσότερο καλλιεργούμενη ποικιλία μαρουλιού στην Κρήτη, κατά τον έλεγχο αντίδρασης των ποικιλιών παρουσίασε σχετικά μικρή συχνότητα εμφάνισης συμπτωμάτων (2/35, δηλαδή 5,71%).

Οι Εικόνες 23 και 24 που ακολουθούν, είναι ενδεικτικές των συμπτωμάτων που παρατηρήθηκαν σε φυτά μαρουλιού, ποικιλίας *Regina dei Ghiacci*.



Εικόνα 23. Συμπτώματα προσβολής του LMV-Χα, σε φυτό της ποικιλίας *Regina dei Ghiacci*.



Εικόνα 24. Σπορόφυτο μαρουλιού ποικιλίας *Regina dei Ghiacci*, μολυσμένο με τον LMV(δεξιά), συγκριτικά με υγιές φυτό (αριστερά).

4. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΜΕ ΑΦΙΔΕΣ

Για τον έλεγχο της μετάδοσης του ιού με αφίδες, χρησιμοποιήθηκαν άπτερα άτομα από τα είδη *Myzus persicae* και *Aphis fabae*, της οικογένειας *Aphididae*. Οι αφίδες, μετά την συλλογή τους, παρέμεναν σε κλωβούς, όπου εκτρέφονταν σε φυτά καπνού (*Nicotiana rustica*).

Οι δοκιμές, έγιναν με την τεχνική της μη έμμονης μετάδοσης. Φυτά από τον φυτοδείκτη *C. quinoa* στον οποίο είχε διατηρηθεί ο ιός, καθώς και φυσικά ή μηχανικά μολυσμένα φυτά μαρουλιού, χρησιμοποιήθηκαν για τη μετάδοση του ιού, σε υγιή φυτά μαρουλιού.

Κατά την τεχνική αυτή, συλλέγονταν ομάδες πέντε συνήθως ατόμων από κάθε είδος, με τη βοήθεια ειδικού πινέλου. Οι αφίδες παρέμεναν σε νηστεία για δύο ώρες σε ειδικά ασφαλισμένο δοκιμαστικό σωλήνα, σε σκιερό περιβάλλον.

Μετά το πέρας των δύο ωρών, οι αφίδες μεταφέρονταν στο μολυσμένο φυτικό φορέα και παρέμεναν εκεί να τραφούν για δύο λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρονταν στο υγιή φυτό μαρουλιού ποικιλίας *Romana*, όπου τρέφονταν και πάλι για δυο λεπτά, χρόνος αρκετός για να μεταφερθεί ο ιός. Τελικά τα άτομα θανατώνονταν.

Τελικά, μετά από μακροσκοπικό έλεγχο, δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα σε κανένα από τα 10 φυτά. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με το αποτέλεσμα των δοκιμών μηχανικής μετάδοσης του ιού στην ποικιλία μαρουλιού *Romana*, που αναφέρθηκε προηγούμενα.

5. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΜΕ ΤΟ ΣΠΟΡΟ

Η ικανότητα μετάδοσης με το σπόρο, είναι χαρακτηριστικό ορισμένων ταξινομικών ομάδων ιών και στηρίζεται στην παρουσία του ιού στο έμβρυο, τις κυτταρικές μεμβράνες, το ενδοσπέρμιο και σε μικρότερο ποσοστό στο περικάρπιο. Προκειμένου να διαπιστωθεί η ικανότητα μετάδοσης του LMV-Χα με το σπόρο και επομένως η παρουσία του ιού σε αυτόν, χρησιμοποιήθηκαν οι σπόροι που παράχθηκαν από τα τρία φυσικά μολυσμένα φυτά που είχαν μεταφερθεί στο θερμοκήπιο.

Η προετοιμασία των σπόρων, περιελάμβανε την συγκέντρωσή τους από κάθε φυτό ξεχωριστά και την παραμονή τους στο ψυγείο για δυο εικοσιτετράωρα για να γίνει διακοπή του ληθάργου.

Στους σπόρους αυτούς έγιναν δύο έλεγχοι για την παρουσία του ιού, με τη βοήθεια της δοκιμής DAS-ELISA. Πρόκειται για την περισσότερο χρησιμοποιούμενη μορφή της τεχνικής ELISA, που ονομάζεται “διπλό σάντουιτς” και στοχεύει στην ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών στο πολλαπλασιαστικό υλικό.

Κατά την δοκιμή αυτή, χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικό σκεύασμα της εταιρίας ADGEN Agrifood Diagnostier, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του ιού LMV και ακολουθήθηκε ακριβώς η μεθοδολογία που συνιστούσε η εταιρία. Τόσο η γ-ανοσοσφαιρίνη, όσο το σύζευγμα (γ-ανοσοσφαιρίνη+ αλκαλική φωσφατάση) αλλά και το υπόστρωμα αραιώθηκαν σε αναλογία 1:1000 (mg/ml). Γενικότερα η δοκιμή DAS-ELISA, περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Αιώρηση της γ-ανοσοσφαιρίνης των αντισωμάτων, σε ρυθμιστικό επικάλυψης (Coating buffer) και προσθήκη 100μl ανά κυψελίδα της πλάκας.
2. Τοποθέτηση της πλάκας σε πλαστικό κουτί με υγρό χαρτί και στεγανοποίηση αυτού. Ακολουθεί επώαση της πλάκας στους 37° C για 4 ώρες.
3. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις της πλάκας με PBS+T (phosphate buffered saline +Tween 10). Κατά την έκπλυση γίνεται γέμισμα των κελιών της πλάκας με PBS+T και στη συνέχεια απομάκρυνση του.
4. Παραλαβή φυτικού δείγματος και ομογενοποίηση σε γουδί πορσελάνης, με την προσθήκη της ανάλογης ποσότητας από το ρυθμιστικό εξαγωγής (extraction buffer) σε αναλογίες 1:5-1:10 (gr/ml). Τα ομογενοποιημένα δείγματα διατηρούνται στο ψυγείο (4° C) μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.
5. Μετά την επώαση και πλύση της πλάκας, όπως περιγράφηκε στο (2) και (3), ακολουθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων στις κυψελίδες. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μικροπιπέτα, με την οποία παίρνουμε ποσότητα 100μl από το αιώρημα κάθε δείγματος, καθώς και από τον θετικό και αρνητικό μάρτυρα που έχουν παρασκευαστεί με τον ίδιο τρόπο.
6. Η πλάκα τοποθετείται ξανά στο κουτί (2) και παραμένει εκεί, για 16 ώρες στους 4° C.
7. Έκπλυση της πλάκας όπως περιγράφηκε στο (3).
8. Αιώρηση της γ-ανοσοσφαιρίνης+ αλκαλικής φωσφατάσης (αντισώματος-ένζυμου) στο ρυθμιστικό σύζευξης (conjugate buffer) και προσθήκη 100μl από αυτό σε κάθε κυψελίδα της πλάκας.
9. Επώαση της πλάκας (2) στους 37° C για 1 ώρα.
10. Ακολουθούν τέσσερις εκπλύσεις της πλάκας όπως περιγράφεται στο στάδιο (3).
11. Προσθήκη 100μl από το ρυθμιστικό υποστρώματος (substrate buffer) σε κάθε μια από τις κυψελίδες της πλάκας.
12. Τοποθέτηση της πλάκας στο κουτί (2) και διατήρησή της σε θερμοκρασία σκοτεινού δωματίου για 1 ώρα τουλάχιστον.
13. Μέτρηση της πλάκας στο φασμαφωτόμετρο στα 405nm.

A. Έλεγχος σποροφύτων

Ο πρώτος έλεγχος αφορούσε στον έλεγχο των σποροφύτων (seedling test). Μέρος από τους σπόρους που είχαν συλλεχθεί από κάθε φυτό, φυτεύτηκαν σε πλαστικούς δίσκους των 80 θέσεων και παρέμειναν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ και υγρασία 70%) μέχρι την έκπτυξη του τέταρτου έως πέμπτου φύλλου. Τα σπορόφυτα που συλλέχθηκαν μετά από περίπου 15 ημέρες, είχαν μέσο βάρος περίπου 0,5 gr.

Για να γίνει ο έλεγχος με την τεχνική DAS-ELISA, κάθε σπορόφυτο ομογενοποιήθηκε ξεχωριστά σε απολυμασμένο γουδί πορσελάνης, παρουσία 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο, σε δοκιμαστικούς σωλήνες, μέχρι την τοποθέτηση τους στην πλάκα για την πραγματοποίηση του ελέγχου, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Μια σχηματική απεικόνιση της πλάκας, μπορούμε να δούμε στην Εικόνα . Το γράμμα I αντιστοιχεί στα κελιά, που έχει τοποθετηθεί ο θετικός μάρτυρας (δείγμα από μολυσμένο φυτό), ενώ το γράμμα H, αντιστοιχεί στα κελιά με τον αρνητικό μάρτυρα (δείγμα από υγιή φυτά). Στα δύο κελιά με τον συμβολισμό EB περιέχεται ρυθμιστικό εξαγωγής. Τέλος, όλα τα εξωτερικά κελιά της πλάκας περιέχουν απιονισμένο νερό.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
B	H ₂ O	EB	1	7	13	19	21	27	33	39	45	H ₂ O
C	H ₂ O	EB	2	8	14	20	22	28	34	40	46	H ₂ O
D	H ₂ O	H	3	9	15	I	23	29	35	41	47	H ₂ O
E	H ₂ O	H	4	10	16	I	24	30	36	42	48	H ₂ O
F	H ₂ O	I	5	11	17	H	25	31	37	43	49	H ₂ O
G	H ₂ O	I	6	12	18	H	26	32	38	44	50	H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Εικόνα 25 . Σχηματική παράσταση εφαρμογής της δοκιμής DAS-ELISA σε πλάκα πολυεστέρα 96 θέσεων.

I : Μολυσμένος μάρτυρας

H : Υγιής μάρτυρας

EB : Ρυθμιστικό εξαγωγής (extraction buffer)

H₂O : Απιονισμένο νερό

Μετά το τέλος της δοκιμής, γινόταν ανάλυση της κάθε πλάκας στα 405 nm, με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου τύπου Merck MIOS junior. Οι κυψελίδες που είχαν τιμές απορρόφησης τουλάχιστον δύο φορές το Μέσο Όρο των τιμών των τεσσάρων κυψελίδων με τους υγιείς μάρτυρες θεωρούνταν ως θετικά δείγματα, δηλαδή πιστοποιείτο η παρουσία του ιού LMV.

Αποτελέσματα

Συνολικά ελέγχθηκαν για την παρουσία του LMV 176 σπορόφυτα μαρουλιού, θυγατρικά των δύο φυσικά μολυσμένων φυτών. Τα αποτελέσματα του ελέγχου παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα V.

Πίνακας V. Αποτελέσματα ανίχνευσης του ιού LMV-Χα, σε σπορόφυτα προερχόμενα από σπόρους φυσικά μολυσμένων φυτών μαρουλιού.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΣΠΟΡΟΙ	ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ	ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ
<i>Parris Island Cos No1</i>	160	100	2/100 (2%)
<i>Parris Island Cos No2</i>	160	76	1/76 (1,3%)

Από τα 100 σπορόφυτα της *Parris Island Cos No1*, μόνο δύο βρέθηκαν μολυσμένα, ενώ από τα 76 της ποικιλίας *Parris Island Cos No 2* βρέθηκε μόνο ένα. Πρέπει να σημειωθεί, ότι μεγάλο ποσοστό σπόρων δεν φύτρωσε ή έδωσε καχεκτικά σπορόφυτα που δεν ήταν δυνατόν να ελεγχθούν για την παρουσία του ιού, επειδή δεν αναπτύχθηκαν. Πιθανότατα, για το γεγονός αυτό ευθύνεται η μόλυνση των μητρικών φυτών από τον LMV.

Στις Εικόνες 26 και 27, παρουσιάζονται οι αναλύσεις από τον έλεγχο των σποροφύτων. Συγκεκριμένα, οι δύο πρώτες αναλύσεις αφορούν τα σπορόφυτα που προέκυψαν από την ποικιλία *Parris Island Cos No1*, ενώ η τρίτη παρουσιάζει τα αποτελέσματα του ελέγχου 76 φυτών της ποικιλίας *Parris Island Cos No2*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3A	0.365	0.374	0.365	0.372	0.364	0.369	0.376	0.381	0.345	0.352	0.365	0.366
3B	0.362	0.438	0.430	0.454	0.422	3.487	0.439	0.420	0.426	0.441	0.426	0.360
3C	0.367	0.434	0.427	0.432	0.423	0.426	0.426	0.423	0.425	0.420	0.425	0.372
3D	0.390	0.439	0.421	0.453	0.437	3.482	0.418	0.408	0.424	0.409	0.421	0.357
3E	0.370	0.431	0.431	0.421	0.429	3.475	0.422	0.416	0.406	0.426	0.420	0.344
3F	0.361	3.454	0.402	3.478	0.432	0.429	0.415	0.431	0.418	0.412	0.430	0.355
3G	0.361	3.484	0.451	0.443	0.415	0.423	0.412	0.416	0.406	0.423	0.433	0.348
3H	0.382	0.367	0.367	0.369	0.366	0.347	0.349	0.362	0.356	0.366	0.342	0.350
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4A	0.388	0.375	0.348	0.376	0.370	0.392	0.357	0.340	0.361	0.345	0.346	0.354
4B	0.371	0.448	0.436	0.430	0.442	0.429	0.444	0.429	0.431	0.417	0.440	0.337
4C	0.387	0.454	0.418	0.431	0.429	0.429	0.471	0.415	0.413	0.417	0.498	0.354
4D	0.378	0.441	0.460	0.432	0.420	3.435	0.441	0.423	0.455	0.422	0.436	0.344
4E	0.373	0.440	0.435	0.438	0.419	3.429	0.424	0.416	0.418	0.409	0.426	0.350
4F	0.363	3.437	0.439	0.447	0.430	0.434	0.440	0.433	0.441	0.413	0.425	0.361
4G	0.382	3.476	0.439	0.437	0.426	0.433	0.426	0.465	0.420	0.415	0.444	0.343
4H	0.371	0.370	0.371	0.394	0.358	0.403	0.364	0.363	0.374	0.355	0.352	0.346

Εικόνα 26. Αποτελέσματα της ανάλυσης (A_{405}) δύο πλακών της δοκιμής DAS-ELISA σε 100 σπορόφυτα, προερχόμενα από σπόρο φυσικά μολυσμένου φυτού μαρουλιού ποικιλίας *Parris Island Cos* No1.

Όπου οι κυψελίδες με το πράσινο χρώμα αντιστοιχούν στον υγιή μάρτυρα, το μπλε στον μολυσμένο και το πορτοκαλί στα θετικά δείγματα.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1A	0.408	0.382	0.364	0.371	0.376	0.367	0.381	0.380	0.372	0.345	0.343	0.357
1B	0.366	0.405	0.400	0.400	0.414	0.403	0.420	0.428	0.418	0.426	0.408	0.349
1C	0.375	0.405	0.394	0.406	0.410	0.399	0.416	0.402	0.402	0.424	0.416	0.337
1D	0.377	0.398	0.393	0.405	0.409	0.421	0.397	0.405	0.419	0.393	0.404	0.354
1E	0.386	0.415	0.408	0.406	0.407	0.421	0.414	0.411	0.400	0.404	0.409	0.345
1F	0.386	3.460	0.403	0.411	0.422	3.507	0.406	0.424	0.415	0.402	0.414	0.361
1G	0.388	3.465	0.414	0.425	0.418	3.432	0.414	0.401	0.398	0.415	0.417	0.362
1H	0.388	0.377	0.377	0.374	0.352	0.363	0.362	0.361	0.341	0.341	0.336	0.372

	1	2	3	4	5	6	7
2A	0.391	0.353	0.357	0.336	0.353	0.328	0.343
2B	0.392	0.417	3.372	0.401	0.405	0.430	0.396
2C	0.367	0.408	0.416	0.417	0.420	0.432	0.367
2D	0.394	0.407	0.399	0.426	0.385	0.427	0.392
2E	0.370	0.414	0.397	0.420	0.409	0.425	0.433
2F	0.391	3.483	0.413	0.415	0.414	3.467	0.365
2G	0.386	3.466	0.404	0.424	0.418	3.462	0.367
2H	0.366	0.353	0.375	0.398	0.337	0.343	0.299

Εικόνα 27. Αποτελέσματα της ανάλυσης (A_{405}) δύο πλακών της δοκιμής DAS-ELISA σε 76 σπορόφυτα, προερχόμενα από σπόρο φυσικά μολυσμένου φυτού μαρουλιού ποικιλίας *Parris Island Cos No2*.

Όπου οι κυψελίδες με το πράσινο χρώμα αντιστοιχούν στον υγιή μάρτυρα, το μπλε στον μολυσμένο και το πορτοκαλί στα θετικά δείγματα.

Β. Έλεγχος σπόρων

Ο έλεγχος αφορούσε στην ανίχνευση του LMV τόσο στους σπόρους από τα φυσικά μολυσμένα φυτά, όσο και σε σπόρους ποικιλιών εμπορίου. Οι σπόροι ελέγχθηκαν σε ομάδες των 10, των 50 και όπου κρίθηκε απαραίτητο και ένας- ένας.

Οι σπόροι ομογενοποιήθηκαν σε απολυμασμένο γουδί πορσελάνης παρουσία ρυθμιστικού εξαγωγής (2,5ml, 5ml και 1ml, αντίστοιχα). Τα ομογενοποιημένα δείγματα σε κάθε περίπτωση παρέμειναν στο ψυγείο, μέχρι τη διεξαγωγή του ελέγχου. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναφέρθηκε για τον έλεγχο των σποροφυτών.

Αποτελέσματα

Συνολικά ελέγχθηκαν με την δοκιμή DAS-ELISA, 350 σπόροι μεμονωμένα, 160 ανά ομάδες των 10 και 1950 ανά ομάδες των 50 σπόρων. Τα αποτελέσματα της δοκιμής παρουσιάζονται συνολικά στον Πίνακα VI.

Πίνακας VI. Αποτελέσματα ελέγχου σπόρων ποικιλιών μαρουλιού, με την τεχνική DAS-ELISA για την παρουσία του ιού.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΠΟΡΩΝ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ		
	1	10	50
<i>Parris Island No1</i>	12/100	2/5	
<i>Parris Island No2</i>	4/100	2/5	
<i>Parris Island No3</i>		4/5	
<i>Parris Island No4</i>			0/5
<i>Parris Island No5</i>			0/5
<i>Romana</i>		0/1	0/6
<i>Nora Blond</i>			0/5
<i>Gramsi</i>			0/4
<i>Lollo rossa</i>	0/50		3 /4
<i>Santa Anna</i>			0/5
<i>Regina dei Ghiacci</i>	20/100		5/5

Οι σπόροι και από τα τρία φυσικά μολυσμένα φυτά μαρουλιού της ποικιλίας *Parris Island Cos* βρέθηκαν μολυσμένοι σε σημαντικό ποσοστό, που υπερβαίνει το όριο ανοχής (0,1%). Τα στοιχεία αυτά, συγκρινόμενα με εκείνα του ελέγχου των σποροφύτων, φανερώνουν ότι μεγάλο μέρος των σπόρων που δεν φύτρωσαν ή δεν έδωσαν βιώσιμο σπορόφυτο ήταν μολυσμένα με τον ιό και επομένως, η ζημιογόνος δράση του LMV δεν περιορίζεται μόνο στην παραγωγή ποιοτικά απαράδεκτων φυτών μαρουλιού.

Στην Εικόνα 28 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου 100 σπόρων από το φυσικά μολυσμένο μητρικό φυτό *Parris Island Cos* Νο1, όπου σημειώνονται οι 12 θετικές κυψελίδες.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1A	0.306	0.347	0.346	0.327	0.353	0.358	0.387	0.357	0.364	0.356	0.391	0.383
1B	0.350	0.448	0.567	0.488	0.499	0.454	0.567	0.482	0.482	0.546	0.851	0.381
1C	0.371	0.426	0.458	0.549	0.505	0.511	0.543	0.521	0.616	0.491	0.574	0.372
1D	0.348	0.413	0.613	0.481	0.416	3.492	0.508	0.557	0.490	0.572	0.602	0.358
1E	0.365	0.434	1.582	0.970	0.549	3.471	1.890	0.574	0.517	0.578	0.908	0.368
1F	0.357	3.494	0.582	0.595	1.296	0.421	0.594	0.565	0.485	0.592	0.583	0.352
1G	0.374	3.452	0.527	1.337	0.533	0.411	0.447	0.487	0.532	0.596	0.514	0.366
1H	0.365	0.344	0.374	0.363	0.351	0.358	0.351	0.350	0.348	0.342	0.333	0.366
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2A	0.346	0.369	0.377	0.387	0.346	0.396	0.397	0.387	0.336	0.376	0.351	0.344
2B	0.419	0.492	0.595	0.567	0.580	0.602	0.557	0.490	0.484	1.542	0.559	0.356
2C	0.414	0.471	0.453	0.557	0.638	0.522	0.587	0.505	0.556	0.513	0.572	0.358
2D	0.422	0.426	0.593	0.695	0.630	3.472	0.578	0.566	0.480	0.483	3.441	0.364
2E	0.382	0.453	0.548	0.565	0.571	3.493	0.564	0.551	0.599	0.622	0.648	0.376
2F	0.438	3.512	0.501	0.587	0.522	0.449	0.638	0.503	1.586	0.473	0.521	0.392
2G	0.396	3.471	0.459	0.753	0.572	0.459	0.601	0.958	0.504	1.106	0.668	0.342
2H	0.424	0.379	0.394	0.396	0.391	0.421	0.381	0.405	0.379	0.421	0.333	0.416

Εικόνα 28. Αποτελέσματα της ανάλυσης (A_{405}) δύο πλακών της δοκιμής DAS-ELISA, σε 100 σπόρους του φυσικά μολυσμένου φυτού μαρουλιού *Parris Island Cos* Νο1.

Όπου οι κυψελίδες με το πράσινο χρώμα αντιστοιχούν στον υγιή μάρτυρα, το μπλε στον μολυσμένο και το πορτοκαλί στα θετικά δείγματα.

Τα ανάλογα αποτελέσματα του ελέγχου 100 σπόρων του φυσικά μολυσμένου μητρικού φυτού *Parris Island Cos No2*, παρουσιάζονται στην Εικόνα 29, όπου ανιχνεύεται ο LMV στις τέσσερις κυψελίδες με το πορτοκαλί χρώμα.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4A	0.379	0.380	0.355	0.361	0.371	0.360	0.367	0.350	0.331	0.329	0.336	0.328
4B	0.392	0.479	0.568	0.486	0.473	0.505	0.461	0.544	0.508	0.444	0.445	0.365
4C	0.378	0.497	0.787	0.522	0.515	0.523	0.536	0.511	0.466	0.509	0.463	0.368
4D	0.373	0.510	0.536	0.507	0.585	0.464	0.470	0.488	0.521	0.483	0.496	0.362
4E	0.364	0.485	0.517	3.301	0.519	0.497	0.518	0.481	0.480	0.532	0.502	0.338
4F	0.372	3.460	0.507	0.744	0.550	3.504	0.481	0.496	0.445	0.441	0.471	0.354
4G	0.366	3.505	0.490	0.649	0.432	3.470	0.505	0.699	0.444	0.515	0.474	0.371
4H	0.388	0.376	0.383	0.378	0.381	0.362	0.365	0.362	0.369	0.353	0.355	0.346
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5A	0.385	0.380	0.375	0.384	0.384	0.378	0.371	0.424	0.376	0.363	0.359	0.367
5B	0.400	0.476	0.453	0.481	0.580	0.480	0.430	0.443	0.492	0.466	0.453	0.354
5C	0.383	0.440	0.437	0.508	0.471	0.430	0.443	0.468	0.429	0.479	0.454	0.388
5D	0.379	0.441	0.453	3.468	0.499	0.448	0.475	0.449	3.427	0.451	0.531	0.334
5E	0.371	0.460	0.474	0.491	0.455	0.443	0.462	0.464	0.444	0.429	0.445	0.346
5F	0.376	3.483	0.425	0.451	0.482	3.505	3.321	0.416	0.446	0.484	0.637	0.348
5G	0.432	3.476	0.464	0.440	0.465	3.474	0.418	0.446	0.422	0.427	0.438	0.356
5H	0.398	0.382	0.392	0.367	0.388	0.370	0.349	0.369	0.352	0.346	0.364	0.356

Εικόνα 29. Αποτελέσματα της ανάλυσης (A_{405}) δύο πλακών της δοκιμής DAS-ELISA, σε 100 σπόρους του φυσικά μολυσμένου φυτού μαρουλιού *Parris Island Cos No 2*.

Όπου οι κυψελίδες με το πράσινο χρώμα αντιστοιχούν στον υγιή μάρτυρα, το μπλε στον μολυσμένο και το πορτοκαλί στα θετικά δείγματα.

Από τις εμπορικές ποικιλίες μαρουλιού που έγινε έλεγχος στο σπόρο, μόνο σε δύο ανιχνεύθηκε ο ιός. Πρόκειται για τις *Lollo rossa* και *Regina dei Ghiacci*. Στην πρώτη, τα τρία από τα τέσσερα δείγματα των 50 σπόρων ήταν θετικά, αλλά κατά την δοκιμή μεμονωμένων σπόρων, δεν ανιχνεύθηκε ο LMV σε κανέναν από τους 50 σπόρους, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 30.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3A	0.392	0.370	0.393	0.370	0.390	0.383	0.383	0.424	0.373	0.394	0.367	0.352
3B	0.372	0.487	0.488	0.521	0.482	0.499	0.477	0.470	0.534	0.516	0.559	0.384
3C	0.379	0.472	0.498	0.501	0.507	0.486	0.551	0.500	0.471	0.447	0.469	0.344
3D	0.383	0.495	0.491	0.507	0.497	0.494	0.462	0.482	0.486	0.476	0.441	0.360
3E	0.377	0.487	0.515	0.479	0.488	0.482	0.474	0.488	0.461	0.498	0.626	0.385
3F	0.374	3.475	0.505	0.517	0.489	3.473	0.488	0.502	0.477	0.478	0.689	0.376
3G	0.388	3.513	0.491	0.474	0.520	3.501	0.479	0.479	0.460	0.465	0.443	0.339
3H	0.441	0.368	0.384	0.380	0.385	0.367	0.389	0.381	0.381	0.399	0.384	0.373

Εικόνα 30. Αποτελέσματα της ανάλυσης (A_{405}) πλάκας της δοκιμής DAS-ELISA, σε 50 σπόρους της ποικιλίας *Lollo rossa*.

Όπου οι κυψελίδες με το πράσινο χρώμα αντιστοιχούν στον υγιή μάρτυρα, το μπλε στον μολυσμένο και το πορτοκαλί στα θετικά δείγματα.

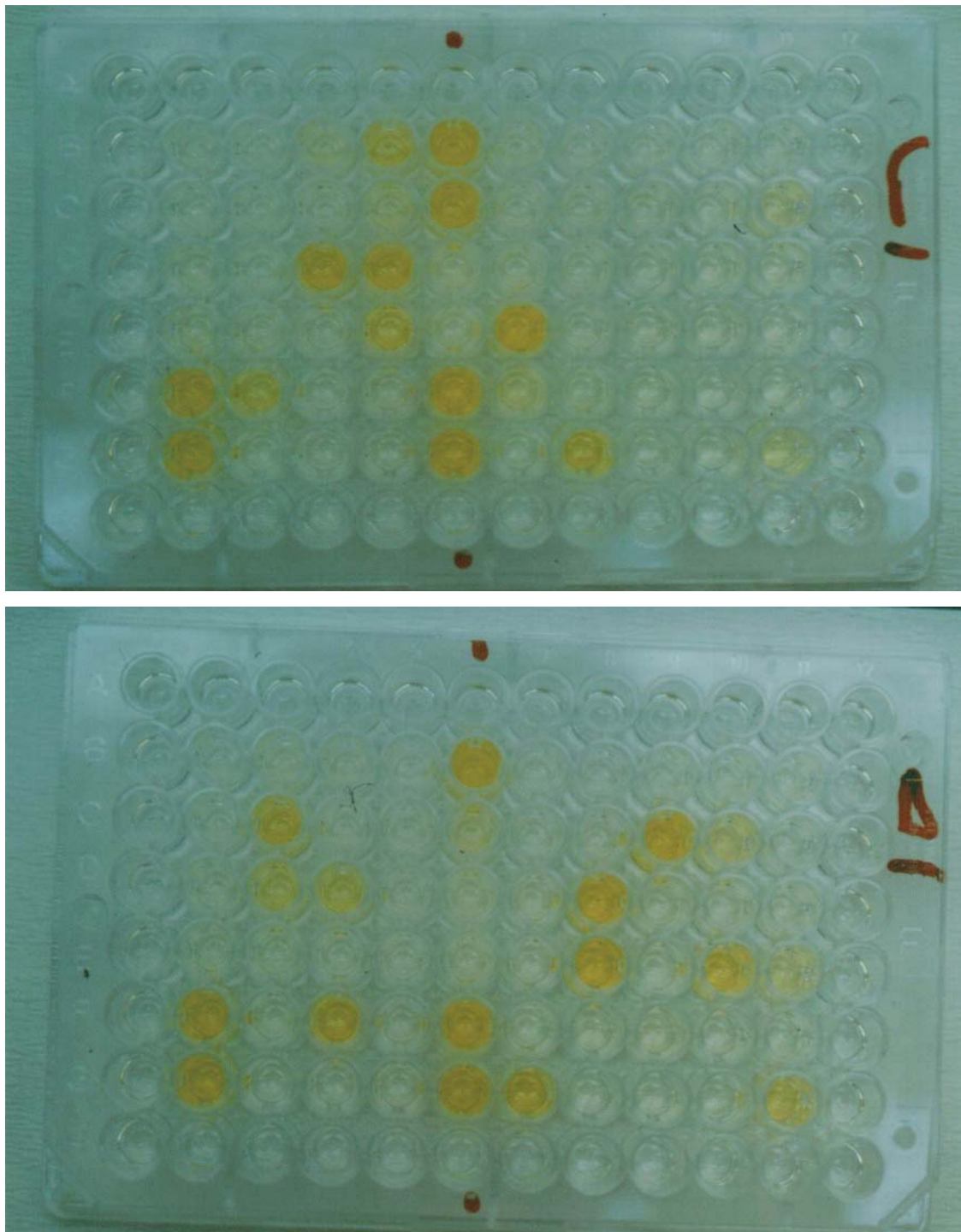
Στην ποικιλία *Regina dei Ghiacci*, διαπιστώθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό μόλυνσης του σπόρου από τον LMV, δηλαδή 20% (Πίνακας VI). Τα αποτελέσματα του ελέγχου 100 σπόρων της ποικιλίας, παρουσιάζονται στην Εικόνα 31, όπου ανιχνεύεται ο LMV στις είκοσι κυψελίδες με το κόκκινο χρώμα.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1A	0.370	0.371	0.341	0.336	0.328	0.366	0.374	0.335	0.339	0.323	0.350	0.340
1B	0.345	0.462	0.462	0.532	0.963	3.484	0.436	0.405	0.411	0.427	0.409	0.318
1C	0.358	0.464	0.439	0.417	0.530	2.849	0.415	0.429	0.404	0.426	0.538	0.343
1D	0.368	0.536	0.398	2.597	1.940	0.450	0.438	0.435	0.377	0.440	0.438	0.342
1E	0.378	0.475	0.436	0.422	0.989	0.457	3.484	0.395	0.428	0.434	0.432	0.348
1F	0.376	3.480	0.936	0.415	0.459	3.481	0.584	0.435	0.422	0.375	0.428	0.361
1G	0.387	3.474	0.406	0.453	0.446	3.491	0.418	1.143	0.412	0.413	0.517	0.285
1H	0.380	0.357	0.397	0.392	0.384	0.367	0.349	0.336	0.365	0.354	0.333	0.350
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2A	0.379	0.360	0.359	0.366	0.352	0.340	0.358	0.327	0.336	0.342	0.357	0.354
2B	0.360	0.429	0.484	0.445	0.405	3.516	0.427	0.397	0.421	0.425	0.428	0.336
2C	0.387	0.429	1.863	0.424	0.398	0.618	0.380	0.421	3.438	0.710	0.409	0.338
2D	0.362	0.458	0.968	1.050	0.430	0.455	0.426	2.878	0.449	0.420	0.425	0.336
2E	0.368	0.450	0.439	0.427	0.408	0.456	0.412	2.946	0.401	1.345	0.616	0.341
2F	0.361	3.513	0.426	2.031	0.407	3.492	0.412	0.426	0.443	0.408	0.390	0.363
2G	0.362	3.473	0.391	0.434	0.422	3.464	1.638	0.379	0.412	0.381	1.019	0.353
2H	0.374	0.354	0.339	0.370	0.361	0.336	0.331	0.371	0.345	0.357	0.359	0.341

Εικόνα 31. Αποτελέσματα της ανάλυσης (A_{405}) πλάκας της δοκιμής DAS-ELISA, σε 100 σπόρους της ποικιλίας *Regina dei Ghiacci*.

Όπου οι κυψελίδες με το πράσινο χρώμα αντιστοιχούν στον υγιή μάρτυρα, το μπλε στον μολυσμένο και το πορτοκαλί στα θετικά δείγματα.

Στην Εικόνα 32 που ακολουθεί, απεικονίζονται οι δύο πλάκες της δοκιμής DAS-ELISA, που αντιστοιχούν στην ανάλυση (A_{405}) της Εικόνας 31. Ο κίτρινος μεταχρωματισμός των κυψελίδων, αποτελεί ένδειξη της παρουσίας του ιού στον σπόρο.



Εικόνες 32. Πλάκες της δοκιμής DAS-ELISA, κατά τον έλεγχο 100 σπόρων της ποικιλίας *Regina dei Ghiacci*, που αντιστοιχούν στην ανάλυση (A_{405}) της Εικόνας 31.

Αξίζει τέλος να σημειωθεί, ότι στην ποικιλία *Romana*, στην πλέον καλλιεργούμενη ποικιλία μαρουλιού στην Κρήτη, δεν ανιχνεύθηκε ο LMV.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ιός που δημιούργησε προβλήματα σε καλλιέργεια μαρουλιού στη Δυτική Κρήτη, αποδεικνύεται να είναι ο LMV. Η ποικιλία που εμφάνισε το πρόβλημα (Parris Island), έδειξε ευπάθεια στη μόλυνση του ιού, ο οποίος και διαιωνίστηκε με το σπόρο των μολυσμένων μητρικών φυτών.

Μολονότι ο έλεγχος των 250 σπόρων, των δύο εμπορικών συσκευασιών της ποικιλίας Parris Island ήταν αρνητικός, δεν αποκλείεται το γεγονός της παρουσίας του ιού στον εμπορικό σπόρο και επομένως στην εμφάνιση του προβλήματος.

Βέβαια, ο LMV είναι ενδημικός στην Κρήτη, καθώς βρέθηκε να προσβάλλει εκτός από τις καλλιέργειες μαρουλιού και εκείνες του ρεβιθιού. Συνεπώς η υπόθεση να μεταφέρθηκε με ιοφόρες αφίδες δεν μπορεί να αποφευχθεί.

Ο ιολογικός έλεγχος στους σπόρους εμπορικών ποικιλιών έδειξε ότι δύο από τις εννέα ποικιλίες ήταν μολυσμένες από τον LMV. Η διάθεση μολυσμένων σπορομερίδων για καλλιέργεια θα διαιωνίζει το πρόβλημα του LMV και εκτός της άμεσης ζημιάς θα δημιουργεί ορατό κίνδυνο εισαγωγής και εγκατάστασης νέων απομονώσεων του ιού, αφού το πολλαπλασιαστικό υλικό εισάγεται και ακόμη δεν έχει τεθεί σε ισχύ η παραγωγή και εμπορία πιστοποιημένου σπόρου στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Dinant S. and H. Lat, 1992. Lettuce mosaic virus. *Plant Pathology*, 41:528-542.
- Tomlinson J.A., 1996. Lettuce mosaic Potyvirus.
IN : *Viruses of Plants. Descriptions and Lists VIDE Database*
(Brunt A.A. et al. Eds). CAB International, 715-721.
- Clark, M.F. and Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virology*. 34, 475-483.
- Hull R. 2002, *Matthew's Plant Virology*. ACAMEDIC PRESS. 1001p.