

ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ВИРУСИ ПО ФАСУЛА В ЮЖЕН ЦЕНТРАЛЕН РАЙОН НА БЪЛГАРИЯ

ГАНЧО ПАСЕВ

Институт по зеленчукови култури „Марица“, Пловдив

Identification of Bean Viruses in South Central Region of Bulgaria

G. Pasev

Maritsa Vegetable Crops Research Institute, Plovdiv, Bulgaria

E-mail: gipasev@aol.com

Abstract

Bean viruses cause significant damages on quantity and quality of bean production. The aim of the current investigation is to identify the virus species, spread on beans grown in south central region of Bulgaria. The collected leaf samples were analyzed by PTA-, DAS- and TAS-ELISA using serums against poty-, cucumo-, alfamo-, faba- and necroviruses. The most spread appeared to be the potyviruses in single and mixed infection. *Bean common mosaic virus* (BCMV) was established in significant part of the samples, followed by *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) and *Clover yellow vein virus* (CIYVV). *Cucumber mosaic virus* (CMV) was the second most important virus disease of this crop. *Alfalfa mosaic virus* (AMV) was identified in two samples. A new degenerative primer pair named Poty-B-deg-F/PotyB-deg-R was designed and used in RT-PCR analysis for identification of members of genus *Potyvirus*. The elaborated primers successfully amplified a single fragment of about 406 bp. The effectiveness of serological and molecular methods for identification of potyviruses was compared.

Key words: potyvirus, ELISA, RT-PCR, degenerate primers

Едни от най-важните вируси по фасула (*Phaseolus vulgaris* L.), причиняващи значителни поражения в количеството и качеството на продукцията, са представители на род *Potyvirus*. Най-често срещаните представители от този род, установени по фасула, са вирусът на обикновената фасулева мозайка (*Bean common mosaic virus*, BCMV), вирусът на обикновената некротична фасулева мозайка (*Bean common mosaic necrosis virus*, BCMNV), вирусът на жълтата мозайка по фасула (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) и вирусът на жълтите вени по детелината (*Clover yellow vein virus*, CIYVV) (Mavrič and Šuštar-Vozlič, 2004; Makkouk et al., 2012). Всички те се пренасят от представители на сем. *Aphididae*, по неперзистентен начин (Kennedy et al., 1962; Zettler, 1966). Освен чрез листни въшки, BCMV и BCMNV се пренасят лесно и чрез семена. Присъствието им в семената може да варира от 40 до 54% при някои сортове в зависимост от конкретния щам на вируса (Morales and Castano, 1987). Други автори посочват, че семенното пренасяне на вируса може да достигне до 83% (Schippers, 1963). За разлика от BCMV и BCMNV, BYMV и CIYVV не се пренасят със семената на фасула (Kennedy et al., 1962).

Изследвания върху потивирите по фасула в България и в частност вируса на обикновената фасулева мозайка са провеждани от Kostova and Poryazov (1989), Костова и др. (1995), Цорлианис (2001) и Kostova et al. (2003). Констатирани са предимно мозаични и некротични изолати на BCMV, както и един изолат на BCMNV. Първото съобщение за CIYVV по фасула в България е направено от Цорлианис (2001), Kostova and Tzorlianis (2006).

Същите автори провеждат и пресяващи тестове за търсене на устойчивост в устойчива на BCMV/ BCMNV генплазма фасул. Първите изследвания относно симптоматиката на заболяването при фасула, причинено от BYMV по фасула е направено от Ковачевски (1972). Той изследва и кръга гостоприемници на вируса при естествени условия (Ковачевски, 1973). За осъвременяване на информацията относно вирусния състав по фасула е наложително провеждането на подобно изследване.

Целта на настоящото изследване беше да се идентифицират вирусите по фасула в някои райони на България, като специално внимание се отделя на видовото разнообразие на потивирите.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал. През периода юни-септември 2010 – 2012 г. са събрани 72 листни проби от посеви зелен фасул с вирусоподобни симптоми от Южен централен район на България. Симптомите се изразяваха в мозайка, ивичестост покрай жилките, деформация на петурата в различна степен и задържане в растежа.

Серологични тестове. Растителните проби са анализирани серологично за идентифициране на потивирите: BCMV, BCMNV, BYMV, CIYVV, *Watermelon mosaic virus* (WMV2) и *Soybean mosaic virus* (SMV); Кукумовируси: *Cucumber mosaic virus* (CMV) и *Peanut stunt virus* (PSV); Алфамовируси: *Alfalfa mosaic virus* (AMV); Фабавируси – *Broadbean wilt virus 1* (BBWV1), *Broadbean wilt virus 2* (BBWV2) и некровируси: *Tobacco necrosis virus* (TNV) с мощта на Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-

ELISA), Triple antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA) (Clark and Adams 1977) и Plate-Trapped Antigen ELISA (PTA-ELISA) (Koenig 1981), спазвайки стандартните протоколи. Използвани са комерсиални серуми (табл. 1). Отчитането на цветовата реакция и при трите вида ELISA е осъществено 60 min след накапване на субстрата с помощта на спектрофотометър Biotek Elx808 при 405 nm. За позитивни се приемаха сигнали със стойности на оптичната плътност (OD) минимум три пъти по-високи от тези на отрицателната контрола.

Молекулярен анализ

Изолиране на РНК. Събраните фасулеви изолати бяха възстановени върху чувствителен сорт фасул. Обща РНК е изолирана от листен материал с ясни вирусни симптоми с Plant RNA Gene-Jet Extraction kit (Thermo Scientific Inc.), съгласно инструкциите на производителя. По същия начин РНК е изолирана и от 8 потивируса (BCMV, щам NY15; BCMNV, щам NL3; BYMV; CIYVV; CIYVV 505/7; PVY; SMV; WMV и ZYMV) и един кукумовирус (CMV), използвани като контроли за тестване на дегенеративна праймерна двойка за идентифициране на потивируси. Концентрацията на РНК е измерена на спектрофотометър (Camspec M501, Cambridge, UK) с микрокувета Hellma Traucell. кДНК е синтезирана с помощта на First strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific Inc.), съгласно инструкциите на производителя. За провеждане на реакцията са използвани dT18 олигонуклеотиди и 0,3 µg обща РНК.

Дизайн на праймери. За конструирането на праймери за идентифициране на представителите на род *Potyvirus* са използвани секвенции на 10 потивируса от базата данни National Center for Biotechnology Information (NCBI).

RT-PCR анализ

Анализът за идентифициране на потивируси с дегенеративните праймери е проведен в реакционната смес от 25 µl, съдържаща компонентите: 1x PCR буфер, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 0,3 µM праймери и 0,2 U BioTaq™ Polymerase (Bioline reagents Ltd., London, UK) и 1 µl кДНК. Реакцията на амплификация е проведена в машина TGradient (Biometra GmbH, Germany) с PCR програма от 35 цикъла, съдържащи стъпките: първите 5 цикъла включваха начална денатурация за 4 min при 95 °C, последвана от денатурация за 30 s на 94 °C, прикачване на праймерите за 30 s на 49 °C и удължаване на веригата за 45 s на 72 °C; останалите 30 цикъла съдържаха същите стъпки като температурата на прикачване на праймерите бе повишена до 51 °C.

След амплификацията, аликуота от 5 µl на PCR продуктите е анализирана върху 1% TAE агарозен гел за 40 min при 100 V. Фрагментите бяха оцветени с DNA StainG (Serva, Germany) и визуализирани под UV светлина.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Серологично идентифициране на вирусния състав по фасула

От събраните 72 листни проби вирусно присъствие е установено серологично в 59 проби. Три-

надесет проби не реагираха с нито един от използваните 15 серума. С помощта на моноклонален антисерум за потивируси IgG 0573/1 (DSMZ) в ПТА ELISA е констатирано присъствие на потивируси в 47 от тестваните 72 проби (фиг. 1). В 21 проби е констатиран само потивирус в единична инфекция; в 11 – положителната реакция за потивирус бе съпроводена и с положителна за CIYVV; една проба реагира положително за CIYVV и отрицателно за потивирус. При 11 проби е констатирана смесена инфекция от три вируса – потивируси, CIYVV и CMV. В 5 проби CMV е в единична инфекция. Двойна инфекция Poty/CIYVV и Poty/CMV е отчетена в 11 и 4 проби съответно.

Анализираните чрез ПТА ELISA 72 проби бяха подложени и на DAS/TAS ELISA. В 41 проби е констатирано присъствие на BCMV: 40 проби реагираха положително за този вирус и с трите серума - IgG-0915 (DSMZ), A399 и A288 на IVV; един изолат реагира

Таблица 1. Реагенти за DAS-, TAS-ELISA и ПТА-ELISA
Table 1. Reagents for DAS-TAS-ELISA and PTA ELISA

Reagent	Origin	IgG ³	IgG-AP ⁴
DAS-ELISA			
BCMV A399	IVV ¹	1: 500	1: 500
BCMV A288	IVV	1: 500	1: 500
BCMNV 257	IVV	1: 500	1: 500
BCMNV 0239	DSMZ ²	1: 1000	1: 1000
BYMV 0717	DSMZ	1: 1000	1: 1000
CIYVV 0243	DSMZ	1: 500	1: 1000
CIYVV A103	IVV	1: 500	1: 500
BYMV A287	IVV	1: 500	1: 500
CMV 0929	DSMZ	1: 1000	1: 1000
AMV 0779	DSMZ	1: 500	1: 1000
WMM 0203	DSMZ	1: 500	1: 500
SMV 0543	DSMZ	1: 500	1: 500
BBWV1 0191	DSMZ	1: 1000	1: 500
BBWV2 0862	DSMZ	1: 1000	1: 1000
TNV 0070	DSMZ	1: 1000	1: 1000
PSV	Sediag	1: 200	1: 200
TAS-ELISA			
BCMV 0915	DSMZ	1: 1000; Mabs ⁵ 1: 250	RAM ⁶ 1: 500
PTA-ELISA			
Potyvirus 0573/1	DSMZ	MABs 1: 1000	RAM 1: 1000
CIYVV A103	IVV	1: 750	GAR 1: 30 000
CMV A326	IVV	1: 750	GAR 1: 30 000

Legend: ¹IVV - Istituto di Virologia Vegetale, Torino, Italy;
²DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen;
³IgG - Primary Antibody;
⁴IgG-AP - Alkaline phosphatase - Conjugated Antibody;
⁵Mabs - Monoclonal Antibody;
⁶RAM - Rabbit Anti-Mouse IgG Antibody, Alkaline Phosphatase conjugate;
⁷GAR - Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Alkaline Phosphatase conjugate.

Таблица 2. Секвенции от NCBI за конструиране на дегенеративна праймерна двойка за идентифициране на потивируси
Table 2. Sequences of NCBI for designing of degenerate primer pair for potyvirus identification

Virus	Accessions from NCBI
BCMV	NC_004047.1, HQ229995.1, HQ229993.1, HQ229994.1;
BYMV	NC_003397.1, L15331.1, GQ219793.1, EU761198.1, AJ312437.1, AJ312437.1;
BYMV	JX173278.1, NC_003492.1, U47033.1, AY192568.1
BICMV*	AY575773.1;
CIYVV	NC_003536.1, AB011819.1;
PSbMV*	NC_001671.1;
PStV*	U34972.1, U05771.1, AY968604.1;
SMV	AY968604.1, HQ166265.1, JF833014.1, JF833013.1, HQ166266.1;
WMV	FJ823122.1, NC_010736.1, NC_009995.1, NC_006262.1;
YMV*	NC_004752.1, U42596.1.

*BICMV - *Blackeye cowpea mosaic virus*; PSbMV - *Pea Seed-borne Mosaic Virus*; PStV - *Peanut stripe virus*;
YMV - *Yam mosaic virus*.

специфично за присъствие на BCMV единствено с антисерумите на IVV (фиг. 2). В 28 от тези проби BCMV е в единична инфекция; в 12 проби – в двойна инфекция със CMV, а в една – в комбинация с BYMV. BYMV е установен в единична инфекция в 5 проби, а CIYVV – в една проба. Люцерновомозаичният вирус е установен в една проба в единична инфекция и в една – в двойна със CMV. Единична инфекция със CMV е констатирана в 7 проби. Серологично не е доказано наличие на BCMNV, PSV, BBWV1, BBWV2, WMV, SMV и TNV в нито една от тестираните проби.

Обобщените резултатите от двата анализа показваха еднопосочност по отношение на присъствие на потивирус при PTA ELISA и за присъствие на потивируси като BCMV, BYMV, CIYVV при DAS/TAS ELISA е отчетено при 28 проби, в които вирусът е в единична инфекция. Единична инфекция и при двата анализа са отчетени за CIYVV в една проба и за CMV в 4 проби. Смесени инфекции на потивирус със CMV са отчетени при 12 проби, както при PTA ELISA, така и при DAS/TAS ELISA. Вирус не е констатиран при 13 проби.

Разминаване на резултатите от двата анализа е констатирано при 13 проби. Три проби, негативни за вирусно присъствие при PTA ELISA, са позитивни за BYMV при DAS ELISA; две проби, негативни за вирусно присъствие при PTA ELISA, са позитивни за BCMV при TAS ELISA. Четири проби, отрицателни за вирусно присъствие при DAS ELISA, са положителни за потивирус и CIYVV при PTA ELISA. При пет проби при DAS ELISA е констатирана единична инфекция съответно от AMV в една проба, смесена от AMV и CMV в една проба и CMV – в три проби. Последните три проби при PTA ELISA са положителни за потивирус, като последните две са в смесена инфекция с CIYVV и CMV.

Молекулярно идентифициране на потивирусите с помощта на дегенеративни праймери

Изолати, които при PTA ELISA реагираха положително за потивирус, са тествани за същата група вируси и молекулярно чрез RT-PCR с помощта

на дегенеративна праймерна двойка. За конструирането ѝ са избрани 32 секвенции на потивируси от NCBI, посочени в табл. 2. Секвенциите бяха подложени на сравнителен анализ с модула Clustal W на програмата MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011). От най-консервативните участъци, кодиращи капсидния протеин (CP) на потивирусите, бяха избрани ляв праймер, означен като PotyB-deg-F, обхващащ семент от нуклеотид 9564 до нуклеотид 9587 и, десен праймер, означен като PotyB-deg-R, обхващащ сегмент от нуклеотид 9949 до нуклеотид 9970 според секвенция U34972.1 на PStV. Двата праймера са дегенеративни и амплифицират единичен фрагмент с големина от около 406 bp (фиг. 3).

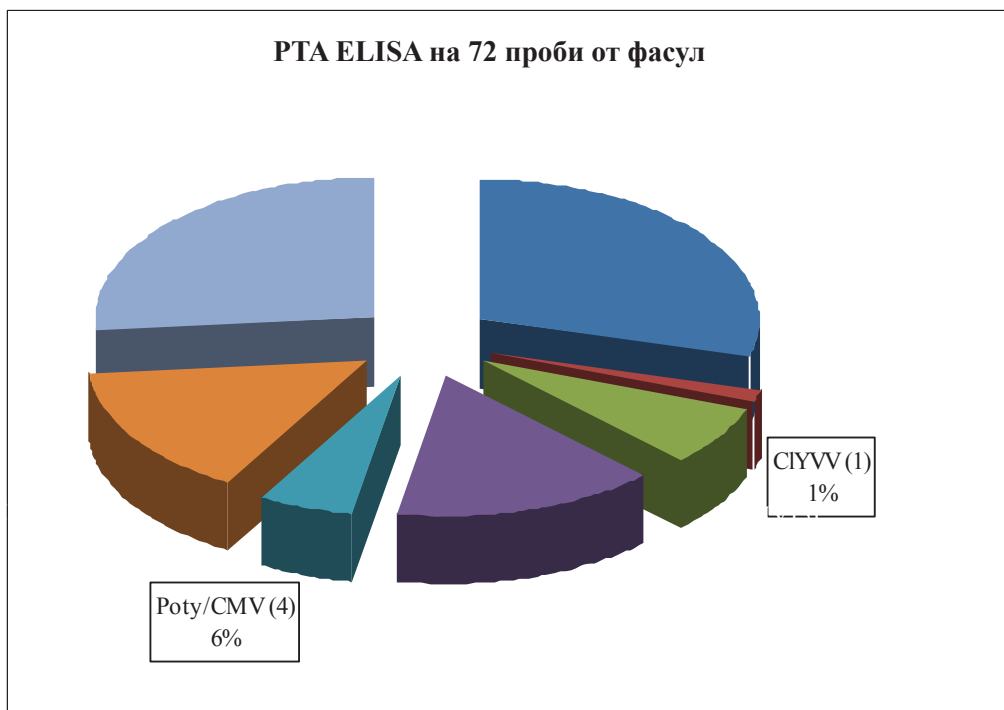
Проведеният анализ за изпитване ефективността на дегенеративната праймерна двойка PotyB-deg-F/PotyB-deg-R с 8 потивируса показва отчетлив фрагмент с очакваните размери от около 406 bp за BCMV, BCMNV, BYMV, CIYVV, PVY, WMV и ZYMV. Фрагмент не бе получен единствено при SMV (фиг. 4).

Праймерите бяха използвани и за RT-PCR на 43 изолата, показали положителна реакция за присъствие на потивирус при серологичните анализи (PTA и DAS/TAS ELISA).

Ампликон беше получен при 41 от тях. Отсъствие на амплификация е наблюдавана при два изолата (21 и 24), които при DAS ELISA дадоха положителен резултат за присъствие на BYMV (фиг. 5).

Серологично, вирусно присъствие бе констатирано в 82% от тестираните проби. При 18% от пробите серологично вирус не бе доказан. В много от случаите отсъствието на серологична положителна реакция и невъзможността да се възстанови вирус от определени проби може да се обясни с погрешна симптоматика на събраната проба или с присъствие на вируси, които не се пренасят механично. Второто съждение обаче е малко вероятно поради факта, че тези вируси се пренасят предимно с *Bemisia tabaci*, която все още се смята, че отсъства от нашата страна.

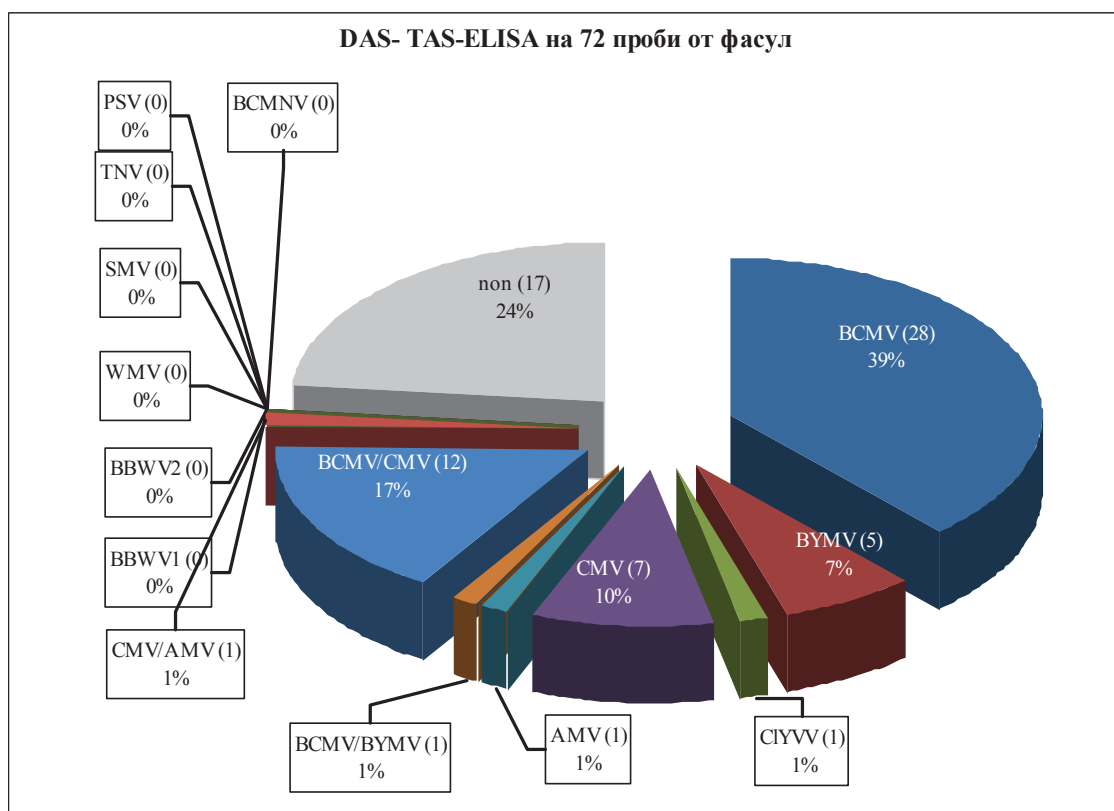
Най-голям дял от установените вируси е този на потивирусите (57,6%), следван от смесените инфекции на потивирусите със CMV (25,4%), смесена



Фиг. 1. Разпределение на вирусния състав по фасула след РТА ELISA

(в скоби е отбелязан броят на пробите в съответната група)

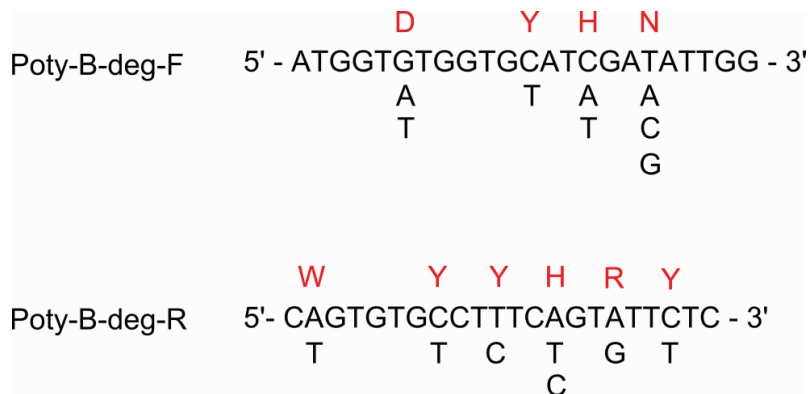
Fig. 1. Viruses on bean identified by RTA ELISA (number of samples are in brackets)



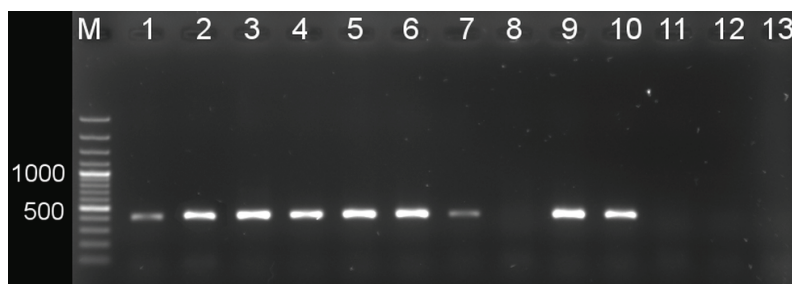
Фиг. 2. Разпределение на вирусния състав при DAS- TAS- ELISA

(в скоби е отбелязан броят на пробите в съответната група)

Fig. 2. Viruses on bean identified by DAS- TAS- ELISA (number of samples are in brackets)

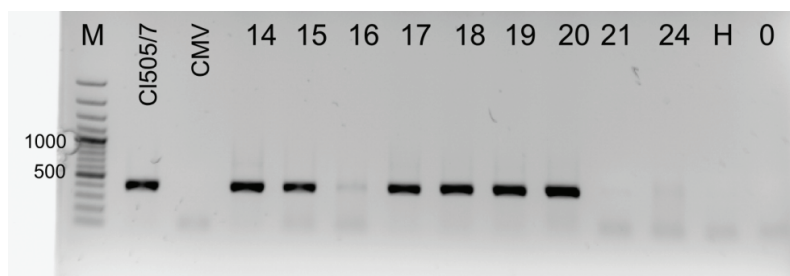


Фиг. 3. Консенсусни секвенции на дегенеративни праймери за идентифициране на потивируси
 Fig. 3. Consensus sequences of degenerate primers for identification of potyviruses



Фиг. 4. RT-PCR продукти на праймерна двойка PotyB-deg-F/PotyB-deg-R с 8 потивируса
 Fig. 4. RT-PCR products of primer pair PotyB-deg-F/PotyB-deg-R with 8 potyviruses

1 - BCMV (NY15); 2 - BCMNV (NL3); 3 - BCMV; 4 - BYMV; 5 - CIYVV; 6 - CIYVV 505/7; 7 - PVY; 8 - SMV; 9 - WMV; 10 - ZYMV; 11 - CMV; 12 - здраво растение/healthy plant; 13 - контрола без матрица/nontemplate control; M - Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder.



Фиг. 5. RT-PCR продукти на праймерна двойка PotyB-deg-F/PotyB-deg-R с изолати, позитивни за присъствие на потивирус от серологичните тестове (номерата на изолатите са показани отгоре)
 Fig. 5. RT-PCR products of primer pair PotyB-deg-F/PotyB-deg-R with isolates positive for potyvirus in serological tests (identity numbers of isolates are shown on the top)

C1505/7 - CIYVV; H - здраво растение/healthy plant; 0 - контрола без матрица/nontemplate control; M - Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

от AMV и CMV 1,7%; единични инфекции от CMV (6,8%), BYMV (5,1%), CIYVV (1,7%) и AMV (1,7%).

Доминиращо присъствие в групата на потивирусите е това на BCMV в 28 проби в единична инфекция, следван от BYMV в шест, и CIYVV в една проба. Подобни резултати относно BCMV и CIYVV са получени и от Цорлианис (2001), но авторът не съобщава за присъствие на BYMV в анализираниите проби. При опитите за диференциране на конкретен потивирус чрез РТА ELISA резултатите показваха присъствие на CIYVV в 22 проби, т. е.

приблизително в 47% от пробите с потивирус. Но при DAS ELISA този резултат не бе потвърден; CIYVV е установен само в една проба. Потвърждение на този резултат е получен и от проведения по-късно RT-PCR анализ. Получените резултати при РТА ELISA за наличие на CIYVV с помощта на серум А103 показват неспецифичността на серума и невъзможността му да разграничи конкретния потивирус. Вирусът на жълтата мозайка (BYMV) е констатиран в 6 проби при DAS ELISA (в единична и смесена инфекция), но само три от тях са поло-

жителни за потивирус при РТА ELISA и четири – при RT-PCR анализа. Това ни дава основание да смятаме, че IgG 0573/1, използван при РТА ELISA, невинаги е успешен за идентифициране на изолати от потивируси.

Шест проби, положителни при РТА ELISA и молекулярния анализ с дегенеративната праймерна двойка за потивирус, но негативни за такъв в DAS/TAS ELISA бяха анализирани за присъствие на други вируси като BBWV1, BBWV2, WMV, SMV и TNV. Резултатите за тези вируси и при шестте проби са негативни. Засега бихме могли да предположим евентуално присъствие на неизвестни потивируси, чиято принадлежност би могла да се определи след секвениране на фрагментите, получени при RT-PCR анализа.

Както се очакваше, CMV се оказва вторият икономически важен вирус по фасула след потивирусите. Двадесет от пробите, положителни за този вирус при РТА ELISA, се оказаха положителни за CMV в единична и смесена инфекция при DAS ELISA. Този вирус е констатиран по фасула в България през последните 15 години (Kostova et al., 2003). Настоящото изследване показва присъствието му в значителна част от анализирани проби. Този вирус е особено опасен при семепроизводството на фасул поради значителния процент на семенно пренасяне, както и поради лесното му пренасяне с вектори.

Успеваемостта на конструирани олигонуклеотиди за идентифициране на род *Potyvirus* в настоящото изследване е повече от 95% (41 идентифицирани от 43 тестирани). Интересно е да се отбележи, че полученият сравнително малък фрагмент (406 bp) след провеждане на PCR реакцията е с еднакви размери при всички изолати. Подобен резултат е получен и от Zheng et al. (2010), които сравняват универсалните праймери Nlb2F and Nlb3R с други две дегенеративни праймерни двойки (Pappu et al., 1993; Gibbs & Mackenzie, 1997), които амплифицират продукти с различни размери. Авторите препоръчват праймерната двойка, която амплифицира малки фрагменти с ниска вариабилност в размера. По този начин резултатите могат да бъдат лесно разчетени и интерпретирани.

ИЗВОДИ

Конструираната универсална праймерна двойка PotyB-deg-F/PotyB-deg-R може успешно да се използва за идентифициране на вируси от род *Potyvirus*.

Комбинирането на серологичните и RT-PCR методи позволяват по-пълно характеризирани и мониторинг на потивирусите по фасула. Това е от съществено значение за насоките на развитие на селекционните програми за устойчивост на потивируси.

ЛИТЕРАТУРА

Ковачевски, И. 1972. Готоприемници на вируса на жълтата мозайка по фасула в България. *Растениевъдни науки*, № 9, 123-140

Ковачевски, И. 1973. Проучвания върху причинителя на жълтата мозайка по фасула. *Растениевъдни науки*, № 10, 124-135

Костова, Д., И. Порязов, В. Лиза, Н. Спенс. 1995. Идентифициране на някои вируси по фасула в България и диференциране на шамове на вируса на обикновената фасулева мозайка. *Растениевъдни науки*, XXXII, № 7-8, 65-68

Цорлианис, С. 2001. Идентифициране и характеризирани на вируси по фасула (*Phaseolus vulgaris* L.) в България във връзка със селекцията на устойчивост. Дисертация. ВСИ, Пловдив.

Clark, M. F., A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of the plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483

Gibbs, A., A. Mackenzie. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 63, 9-16.

Kennedy, J. S., M. F. Day, V. F., Eastop. 1962. A Compendium of Aphids as Vectors of Plant Viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London, 114 p.

Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specific detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 55: 53-62

Kostova, D. and I. Poryazov. 1989. Preliminary results on snap bean resistance to bean common mosaic virus (BCMV) in Bulgaria. Annual report of the Bean Improvement Cooperative, 32: 88-89

Kostova, D. and I. Poryazov. 1995. Progeny assessment of resistance to necrotic NL5 strain of Bean common mosaic virus (BCMV) in some green bean breeding lines. Annual report of Bean Improvement Cooperative, 38: 170

Kostova, D. and S. Tzorlianis. 2006. First report of *Clover yellow vein virus* (CLYVV) in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Bulgaria. *Plant Science* 44:110-113.

Kostova, D., V. Lisa, R. G. Milne, A. M. Vaira, G. Della-valle & S. Tzorlianis. 2003. Virus diseases of vegetable crops in southern Bulgaria. *Phytopathologia Mediterranea*, 42, 3-8

Kostova, D., V. Lisa, R. G. Milne, A. M. Vaira, G. Della-valle and S. Tzorlianis. 2003. Virus diseases of vegetable crops in southern Bulgaria. *Phytopathologia Mediterranea*, 42: 3-8

Makkouk, K., H. Pappu and S. G. Kumari. 2012. Virus diseases of peas, beans, and faba bean in the Mediterranean region. In G. Loebeinstein and H. Lecoq (Eds.). *Advances in virus research* (Vol. 84, p. 367-402). Elsevier Inc.

Mavrič, I. and J. Suštar-Vozlič. 2004. Virus diseases and resistance to Bean common mosaic and Bean common mosaic necrosis potyvirus in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Agriculturae Slovenica*, 83: 181-190

Morales, F. J. and M. Castano. 1987. Seed Transmission Characteristics of Selected BCMV Strains in Differential Bean Cultivars. *Plant Disease*, 71: 51-53

Pappu, S. S., R. Brand, H. R. Pappu et al. 1993. Apolymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 41, 9-20

Schippers, B. 1963. Transmission of bean common mosaic virus by seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Beka. *Acta Botanica Neerlandica*, 12: 433

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739

Zettler, F. W. 1966. Aphid populations in central New York as related to epiphytology of bean common mosaic virus. Thesis (Ph. D.), Cornell University.

Zheng, L., B. C. Rodoni, M. J. Gibbs & A. J. Gibbs. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology*, 59, 211-220