

Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***«Ο ΣΠΟΡΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΟΣ ΙΟΣ ΤΟΥ ΚΟΙΝΟΥ ΜΩΣΑΙΚΟΥ ΤΗΣ
ΦΑΣΟΛΙΑΣ ΣΕ ΤΟΠΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΤΟΥ ΟΡΟΠΕΔΙΟΥ ΛΑΣΙΘΙΟΥ»***

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ : ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΒΡΕΤΖΑΚΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Οροπέδιο Λασιθίου με έκταση περίπου 25.000 στρέμματα και υψόμετρο περίπου 800 μέτρα αποτελεί μια αγροτική περιοχή όπου παραδοσιακά, εκτός της πατάτας, καλλιεργούνται διάφορα ψυχανθή όπως κουκιά, φασόλια, ρεβίθι και λαθούρι. Με τον καιρό στην περιοχή η καλλιέργεια της φασολιάς έχει περιοριστεί σε ορισμένες ποικιλίες, που πιθανόν να προέρχονται είτε από ντόπιες παλιές ποικιλίες είτε από μια μη προγραμματισμένη επιλογή και προσαρμογή στις συνθήκες του Οροπεδίου ξενικών ποικιλιών.

Την προηγούμενη διετία πραγματοποιήθηκε ένα πρόγραμμα επιλογής στις καλλιεργούμενες ποικιλίες φασολιάς του Οροπεδίου που είχε ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό και την συγκέντρωση των πιο σημαντικών από αυτές. Έχοντας στη διάθεση ορισμένες σπορομερίδες από τις τοπικές ποικιλίες φασολιάς του Οροπεδίου Λασιθίου, θεωρήθηκε χρήσιμη η εκτέλεση μιας μελέτης που θα στόχευε στην αξιολόγηση της συμπεριφοράς τους έναντι ενός πολύ διαδομένου σπορομεταδιδόμενου παθογόνου: ο ιός του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς (Bean common mosaic virus, BCMV).

Η πτυχιακή μου εργασία παρουσιάζει τις κυριότερες δραστηριότητες και τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΚΟΙΝΟΥ ΜΩΣΑΪΚΟΥ ΤΗΣ ΦΑΣΟΛΙΑΣ

(Bean common mosaic potyvirus, BCMV)

Ο ιός του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς ανήκει στο γένος *Potyvirus*. Είναι ένας ιός με εύκαμπτα νηματοειδή ισωμάτια μήκους 750 nm και πλάτους 12 -15 nm, που περιέχει RNA μονής αλυσίδας. Μεταδίδεται μηχανικά, με μερικά είδη αφίδων με μη έμμονο τρόπο και διαμέσου του σπόρου και της γύρης. Στη φύση περιορίζεται κυρίως στα είδη *Phaseolus*, ιδιαίτερα στο *P. vulgaris* σε κάθε περιοχή όπου αυτό αναπτύσσεται.

ΚΥΡΙΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Στο *P. vulgaris* εμφανίζονται δύο είδη συμπτωμάτων που εξαρτώνται από τη φυλή του ιού και το γονότυπο του ξενιστή. Το “κοινό μωσαϊκό” που σχετίζεται με τη δυσμορφία των φύλλων και η “μαύρη ρίζα” που χαρακτηρίζεται από διασυστηματική νέκρωση και θάνατο του φυτού. Ο ιός προκαλεί μωσαϊκό στα περισσότερα είδη του γένους *Phaseolous*.

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Παγκόσμια.

ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Στη φύση, ο ιός του κοινού μωσαϊκού εμφανίζεται στα είδη του *Phaseolus*, κυρίως στο *P. vulgaris* και περιστασιακά στο *Lupinus luteus* και σε άγρια Ψυχανθή, όπως το *Rhyncosia minima*. Άλλοι φυσικοί ξενιστές που έχουν αναφερθεί, αλλά δεν έχουν επιβεβαιωθεί, είναι τα είδη *Vigna unguiculata*, *V. radiata* και *Crotalaria striata*. Η πειραματική σειρά ξενιστών (μόλυνση σε εργαστηριακό θερμοκήπιο) περιλαμβάνει τα είδη: *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis*, *Cassia tora*, *Cicer arietinum*, *Crotalaria spectabilis*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Glycine max*, *Lens esculenta*, *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *Macroptilium lathyroides*, *M. atropurpureum*, *Melilotus alba*, *Phaseolus lathyroides*, *Sesbania exaltata*, *Trifolium incarnatum*, *T. subterraneum*, *Trigonella foenum-graecum*, *Vicia faba*, *V. sativa*, *V. villosa*, *Vigna angularis* και *Vigna unguiculata*. Μερικοί μη-ξενιστές (δεν μολύνονται στο εργαστήριο) είναι *Arachis hypogaea*, *Lathyrus odoratus*, *Medicago sativa*, *Pisum sativum*, *Trifolium hybridum*, *T. pratense* και *T. repens*. Ξενιστές που δεν περιλαμβάνονται στα Ψυχανθή είναι τα *Nicotiana clevelandii* και *N. benthamiana*.

Στο *P. vulgaris* και στο *P. coccineus*, οι ανθεκτικές ποικιλίες εμφανίζουν μωσαϊκό και δυσμορφία των φύλλων, ενώ οι ευαίσθητες εμφανίζουν “σχήμα τριαντάφυλλου” στα κατώτερα φύλλα, μωσαϊκό, δυσμορφία των φύλλων και του περικαρπίου των λοβών ή του σπόρου. Αυτές που φέρουν το κυρίαρχο

ανθεκτικό γονίδιο της υπερευπάθειας αντιδρούν με νέκρωση των νεύρων, “μαύρη ρίζα” και τελικά νεκρώνονται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 26 °C.

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΕΙΔΗ

Μερικές ποικιλίες φασολιάς, όπως η *Dubbele Witte* και *Stingless Green Refugee* είναι ευαίσθητες σε όλες τις γνωστές φυλές του ιού. Τα φυτά που προσβάλλονται διασυστηματικά, συνήθως εκδηλώνουν παραμορφώσεις των φύλλων και συστροφή, καθώς και περινεύριο μωσαϊκό (σκούρες πράσινες περιοχές κατά μήκος των κυρίων νεύρων των νεότερων φύλλων). Οι ποικιλίες που διαθέτουν το κυρίαρχο γονίδιο υπερευπάθειας, δεν εμφανίζουν μωσαϊκό, αλλά μερικές εμφανίζουν πολύ μικρές νεκρωτικές κηλίδες. Σε άλλες αναπτύσσεται τοπική νέκρωση των νεύρων και σε άλλες διασυστηματική νέκρωση που οδηγεί στο σύνδρομο της “μαύρης ρίζας” που επεκτείνεται ως το περικάρπιο και τελικά οδηγεί στο θάνατο του φυτού. Ένα σύνολο από διαφορετικές ποικιλίες που διαθέτουν το κυρίαρχο γονίδιο της υπερευπάθειας και/ή διαφορετικά υπολειπόμενα γονίδια, χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της φυλής του ιού.

ΦΥΤΟΔΕΙΚΤΕΣ

Οι ποικιλίες φασολιάς *Dubbele Witte* και *Stringless Green Refugee* αντιδρούν με μωσαϊκό και/ή παραμόρφωση των φύλλων σε όλες τις φυλές του ιού. Η ποικιλία *Monroe* αντιδρά στην τεχνητή μόλυνση (μηχανική μετάδοση), με όλες και τις 5 φυλές του ιού με τοπικές, κυκλικές κηλίδες και νέκρωση που επεκτείνεται μεταξύ των νεύρων. Οι ποικιλίες *Cordon* και *Orfeo-*

INIA παρουσιάζουν μικροσκοπικές, τοπικές κηλίδες χωρίς νέκρωση των νεύρων. Το *Phaseolus lathyroides* και το *Chenopodium quinoa* έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν νεκρωτικές και χλωρωτικές τοπικές περιοχές, αντίστοιχα. Όμως στο *C. quinoa* η αντίδραση εξαρτάται από τη φυλή του ιού.

ΦΥΛΕΣ

Με βάση την παθογένεια σε 9 ομάδες των ποικιλιών του *P. vulgaris* έχουν διαφοροποιηθεί 10 φυλές του ιού.

ΜΕΤΑΔΟΣΗ

1. Με φορείς:

Ο ιός μεταδίδεται με μη έμμονο τρόπο από ορισμένα είδη αφίδων όπως: *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae*, *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *A. medicaginis*, *A. rumicis*, *Hyalopterus atriplicis*, *Macrosiphum ambrosiae*, *M. pisi* και *M. solanifolii*.

Αρκεί τροφική δραστηριότητα για 15 έως 60 δευτερόλεπτα για να προσλάβουν και ένα λεπτό για να μεταδώσουν τον ιό.

2. Με το σπόρο:

Το υψηλό ποσοστό της μετάδοσης με το σπόρο είναι ενδεχομένως ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την εμφάνιση της αρχικής προσβολής της καλλιέργειας και την παγκόσμια διάδοση του ιού. Ανάλογα με το γονότυπο της φασολιάς και τη φυλή του ιού που μολύνει περισσότερο από το 83% του σπόρου που παράγεται από τα μολυσμένα φυτά, μπορεί να δώσει φυτά με συμπτώματα μωσαϊκού. Όμως σε ορισμένες ποικιλίες, όπως *Imuna*, *Great Northern* 31, 123 η μετάδοση με το σπόρο δεν είναι αποτελεσματική για

ορισμένες φυλές του ιού, όπως π.χ. η ποικιλία *Pinto* 114 είναι πολύ ανθεκτική στην προσβολή με σπόρο από τη φυλή US 2. Η μετάδοση με το σπόρο του ιού μειώνεται στα φυτά που μολύνονται μετά την άνθηση.

Ο ιός βρίσκεται στο έμβρυο και είναι ανενεργός στο κάλυμμα του σπόρου μετά την ωρίμανση. Ο ιός επίσης μπορεί να μολύνει το σπόρο μέσω της γύρης. Δεν υπάρχει μετάδοση με σπόρο στους γονότυπους που διαθέτουν το κυρίαρχο γονίδιο της υπερευπάθειας. Στο *P. acutifolius* var. *latifolius* η συχνότητα μετάδοσης με το σπόρο κυμαίνεται από 7-22%.

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ

Ο ιός είναι ανοσογενικός στα κουνέλια και μπορούν να αποκτηθούν πολυκλωνικοί αντιοροί με τίτλους πάνω από 1/2000. Αυτοί οι αντιοροί μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή ELISA, ενώ μετά από αποδόμηση της πρωτεΐνης του καψιδίου των σωματιδίων, στις δοκιμές ανοσοδιάχυσης με πηκτή άγαρ.

ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Το γένωμα αποτελείται από RNA μονής αλυσίδας, επίμηκες και του έχει μέγεθος 10.000 βάσεις. Το M.B. είναι $3,5 \times 10^6$ και αποτελεί περίπου το 5% του βάρους του ιοσωματίου.

Η καψιδιακή πρωτεΐνη, 95% του βάρους του σωματιδίου, συνήθως συνίσταται από ένα κύριο πολυπεπτιδικό είδος που εκτιμάται με ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμιδικά /SDS gels να έχει M.B. $3,2-3,5 \times 10^4$.

Η φυλή US1 του ιού αποτελείται από 2 πρωτεϊνικές ομάδες, που η μια έχει M.B. $3,2 \times 10^4$ και η άλλη $3,4 \times 10^4$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΠΟΡΟΜΕΡΙΔΩΝ (SEEDLING TESTS)

Ο έλεγχος αφορούσε σπορομερίδες έξι ποικιλιών φασολιάς (Μαλλιωτάκια, Γαζανό, Ασπροκόλια, Μπαρμπούνια Β', Άσπρο Ε' και Γιγαντάκια) που προήλθαν από ένα πρόγραμμα επιλογής στο Οροπέδιο Λασιθίου. Η φύτευση έγινε ξεχωριστά (σπόρος ανά πλαστικό γλαστράκι) σε απολυμασμένο μίγμα χώματος, τύρφης και άμμου, σε χώρο υάλινου θερμοκηπίου.

Από κάθε ποικιλία σπάρθηκαν διαδοχικά 1000 σπόροι. Μετά τη βλάστηση τα σπορόφυτα ελέγχονταν μακροσκοπικά για εκδήλωση αλλοιώσεων στο χρώμα και σχήμα του φύλλου, καθώς και στην ανάπτυξη του φυτού. Τα ύποπτα σπορόφυτα καταγράφονταν και μεταφέρονταν σε ξεχωριστό χώρο του θερμοκηπίου (Εικόνα 1).

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

Ο βιολογικός έλεγχος γινόταν με μηχανική μετάδοση σε φυτοδείκτες με ομογενοποίηση συμπτωματικών φύλλων φυταρίων φασολιάς σε

απολυμασμένο γουδί πορσελάνης παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$), 0,1 M και pH 7,2.

Το φυτικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση φυτών που ανήκαν σε διάφορες οικογένειες. Οι φυτοδείκτες προήλθαν από σπορεία σε ειδικό υπόστρωμα και μεταφύτευση σε γλαστράκια με μίγμα απολυμασμένου με ατμό χώματος, τύρφης και άμμου. Στην πρώτη φάση του βιολογικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ως φυτοδείκτες περιορισμένος αριθμός ειδών και κυρίως σπορόφυτα φασολιάς της ποικιλίας *Bountiful*.

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

Μετά τη μόλυνση τα φυτά παρέμειναν σε χώρο του εργαστηριακού θερμοκηπίου με ρυθμιζόμενες συνθήκες θερμοκρασίας ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), υγρασίας ($\approx 70\%$) και βοηθητικού φωτισμού.

Τα αποτελέσματα από τον μακροσκοπικό έλεγχο των σπόρων παρατίθεται στον Πίνακα 1. Από την ποικιλία Μαλλιωτάκια βλάστησαν 974 σπόροι και εμφάνισαν συμπτώματα παρόμοια με εκείνα που προκαλούν ορισμένοι σπορομεταδιδόμενοι ιοί των ψυχανθών: περιορισμένη ανάπτυξη, φύλλα μικρότερα με ποικιλοχλώρωση ή μωσαϊκό, τέσσερα φυτά (Εικόνα 2). Στις ποικιλίες Γαζανό, Ασπροκόλια, Μπαρμπούνια Β', Άσπρο Ε' και Γιγαντάκια βλάστησαν 963, 957, 932, 968 και 949 σπόροι αντίστοιχα και δεν εμφανίστηκαν ανάλογα συμπτώματα σε κανένα από τα φυτά.



Εικόνα 1. Συμπτώματα μωσαϊκού και μικροφυλλίας σε σπορόφυτο της ποικιλίας Μαλλιωτάκια.



Εικόνα 2. Σπορόφυτα της ποικιλίας Μαλλιωτάκια προς το τέλος του ελέγχου (seedling tests). (Τα βέλη δείχνουν τα μολυσμένα με τον BCMV σπορόφυτα).

Πίνακας 1. Μακροσκοπική διάγνωση παρουσίας σπορομεταδιδόμενου ιού σε σπορομερίδες φασολιάς ποικιλιών του Οροπεδίου Λασιθίου.

Ποικιλίες	Αριθμός σπόρων	Αριθμός σποροφύτων	Φυτά με ύποπτα συμπτώματα
------------------	-----------------------	---------------------------	----------------------------------

Μαλλιωτάκια	1000	974	4
Γαζανό	1000	963	0
Ασπροκόλια	1000	957	0
Μπαρμπούνια Β΄	1000	932	0
Άσπρο Ε΄	1000	968	0
Γιγαντάκια	1000	949	0

Τα τέσσερα ύποπτα σπορόφυτα στο βιολογικό έλεγχο έδωσαν συμπτώματα σε ορισμένους φυτοδείκτες. Συγκεκριμένα στα σπορόφυτα της ποικιλίας *Bountiful* εμφανίστηκαν παρόμοια με εκείνα των υπό έλεγχο σποροφύτων της ποικιλίας Μαλλιωτάκια (Εικόνα 3). Ο ιός που απομονώθηκε διατηρήθηκε σε σπορόφυτα *Bountiful* προκειμένου να υφίσταται μόλυσμα για τις περαιτέρω μελέτες.



Εικόνα 3. Σπορόφυτα ποικιλίας *Bountiful* με συμπτώματα προσβολής (αριστερό φυτό, δεξιό φυτό υγιής μάρτυρας).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

Ο ιός που απομονώθηκε στο φυτοδείκτη φασολιά ποικιλία *Bountiful* από τα συμπτωματικά φυτά της ποικιλίας Μαλλιωτάκια πέρασε από ορισμένες δοκιμές ρουτίνας στο εργαστήριο Φυτικής Ιολογίας προκειμένου να ταυτοποιηθεί. Σε αυτές συμπεριλαμβάνεται το εύρος και η αντίδραση φυτοδεικτών, η δυνατότητα μετάδοσης με αφίδες, η παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και τελικά οι ορολογικές δοκιμές.

1. ΦΥΤΟΔΕΙΚΤΕΣ

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

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

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

Μετά τη μόλυνση τα φυτά παρέμειναν σε εργαστηριακό θερμοκήπιο με ρυθμιζόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού. Καθημερινά γινόταν μακροσκοπικός έλεγχος και καταγραφή των συμπτωμάτων. Οι αντιδράσεις των φυτοδεικτών παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.

Αποτελέσματα

Από τους 28 φυτοδείκτες μόνο δύο (2) αντέδρασαν με ευκρινή συμπτώματα :

- Η φασολιά ποικιλίας *Bountiful* (Εικόνα 3)
- Ένα άγριο είδος *Nicotiana*, *N.benthamiana* (Εικόνα 4)

Πίνακας 2. Εύρος ξενιστών και συμπτωματολογικές αντιδράσεις

ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	
	Τοπικά	Διασυστηματικά
<i>Fabaceae</i>		
<i>Vicia faba cv. Aqua Dolce</i>	-	-
<i>Lupinus albus</i>	-	-
<i>Phaseolus vulgaris cv. Bountiful</i>	-	SS Mot, D *
<i>Phaseolus aureus</i>	-	-
<i>Vigna sinensis</i>	-	-
<i>Pisum sativum cv. Karina</i>	-	-
<i>Solanaceae</i>		
<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>	-	SS Mot, D
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	-
<i>Lycopersicon esculentum cv. Belladonna</i>	-	-
<i>Petunia hybrida</i>	-	-
<i>Solanum nigrum</i>	-	-
<i>Cucurbitaceae</i>		
<i>Cucumis melo</i>	-	-
<i>Cucurbita pepo</i>	-	-
<i>Cucumis sativus</i>	-	-
<i>Compositae</i>		

<i>Calendula officinalis</i>	-	-
<i>Zinnia elegans</i>	-	-
<i>Lactuca sativa cv. Romana</i>	-	-
<i>Caryophyllaceae</i>		
<i>Dianthus barbatus</i>	-	-
<i>Amaranthaceae</i>		
<i>Gomphrena globosa</i>	-	-
<i>Chenopodiaceae</i>		
<i>Spinacia oleracea cv. Viroflay</i>	-	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	-	-

* **SS Mot, D** : Διασυστηματικά συμπτώματα ποικιλοχλώρωσης και παραμορφώσεων.

- : δεν μολύνθηκε.



Εικόνα 4. Διασυστηματικά συμπτώματα στο φυτοδείκτη *N.benthamiana*.

2. Μετάδοση με τις αφίδες

Για τον έλεγχο της δυνατότητας 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 *Bountiful* στον οποίο είχε διατηρηθεί ο ιός, καθώς και φυσικά ή μηχανικά μολυσμένα φυτά φασολιάς, χρησιμοποιήθηκαν για τη μετάδοση του ιού, σε υγιή φυτά φασολιάς.

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 φασολιάς ποικιλίας *Bountiful*, όπου τρέφονταν και πάλι για δυο λεπτά, χρόνος αρκετός για να μεταφερθεί ο ιός. Τελικά τα άτομα θανατώνονταν με ψεκασμό αφιδοκτόνου (Πυρεθρίνη).

Αποτελέσματα

Από τα είκοσι (20) σπορόφυτα φασολιάς *Bountiful* που δοκιμάστηκαν στα δύο είδη αφίδων (δέκα σπορόφυτα ανά είδος) συμπτώματα παρόμοια με εκείνα των φυτών που τράφηκαν οι αφίδες εμφανίστηκαν σε 9 και 7 σπορόφυτα, αντίστοιχα. Επομένως ο ιός μεταδίδεται αποτελεσματικά με τις αφίδες με μή έμμονο τρόπο.

3. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

Πραγματοποιήθηκε στο Istituto di Patologia Vegetale di Roma Italia χρησιμοποιώντας μολυσμένο χυμό από φύλλα φασολιάς. Μια σταγόνα από το μολυσμένο χυμό τοποθετήθηκε στο ειδικό χάλκινο πλέγμα καλυμμένο με

μεμβράνη άνθρακα, για 10 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε χρώση με δύο σταγόνες 2% φωσφοβολφραμικό οξύ (ΡΤΑ), pH 6 και στη συνέχεια παρατήρηση με φωτογράφιση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Αποτελέσματα

Σε όλα τα πεδία παρατηρήθηκαν νηματοειδή ιοσωμάτια με διαστάσεις 12-15 nm εύρος και 750 nm μήκος, χαρακτηριστικά μορφολογικά στοιχεία φυτικών ιών του γένους *Potyvirus* (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ιοσωμάτια του ιού στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

4. Ορολογικές Δοκιμές

Με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων δοκιμών ο ιός χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες ιδιότητες, όπως μόλυνση περιορισμένου εύρους ξενιστών, μεταδίδεται με μη έμμονο τρόπο με αφίδες και διαθέτει

νηματοειδή ιοσωμάτια τυπικά του Γένους *Potyvirus*. Επομένως είναι ένα είδος του Γένους *Potyvirus* που μολύνει στη φύση τη φασολιά και έχει πολύ περιορισμένο εύρος ξενιστών. Τα χαρακτηριστικά αυτά οδηγούν στην υπόθεση ότι πρόκειται για τον ιό του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς (Bean common mosaic virus, BCMV). Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης και για την ακριβή ταυτοποίηση του ιού έγινε ορολογικός έλεγχος.

Εφαρμόστηκε η δοκιμή ELISA και συγκεκριμένα η τεχνική του διπλού σάντουιτς (DAS - ELISA). Χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικό σκεύασμα της εταιρίας ADGEN Agrifood Diagnostier σχετικό, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του BCMV. Ακολουθήθηκε ακριβώς η μεθοδολογία που συνιστούσε η εταιρία. Τόσο η γ-ανοσοσφαιρίνη, όσο το σύζευγμα (γ-ανοσοσφαιρίνη+ αλκαλική φωσφατάση) αραιώθηκαν σε αναλογία 1:1000 και 1:500 αντίστοιχα. Η διαδικασία αναφέρεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5.

Αποτελέσματα

Τα δείγματα από μολυσμένα φύλλα φασολιάς αντέδρασαν θετικά εμφανίζοντας τιμές απορρόφησης υπερτριπλάσιες του υγιούς μάρτυρα. Επομένως επιβεβαιώνεται ότι ο ιός που απομονώθηκε από σπορόφυτα της ποικιλίας Μαλλιωτάκια είναι μια απομόνωση του BCMV.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΦΑΣΟΛΙΑΣ
ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ BCMV**

Για να ελέγξουμε την αντίδραση διάφορων εμπορικών ποικιλιών φασολιάς στον BCMV χρησιμοποιήθηκαν 15 ποικιλίες που ορισμένες προμηθευτήκαμε από καταστήματα αγροτικών εφοδίων (Αιχέ χαμωτό, Γαζανό, Μπαρμπούνι, Ρεθεμιωτάκι, Borloto, Μπαρμπούνια Β', Άσπρο Ε', Γιγαντάκια, Πυλιάρικο, Βουλγαρίας, Μαυρομάτικο, Atlanta, Majirus, Ασπροκόλια Α' και Ασπροκόλια).

Από κάθε ποικιλία σπάρθηκαν διαδοχικά 50 σπόροι. Φυτέψαμε ξεχωριστά κάθε σπόρο σε πλαστικά γλαστράκια με απολυμασμένο μίγμα χώματος τύρφης και άμμου, τα οποία παρέμειναν σε χώρο υάλινου θερμοκηπίου.

Μετά τη βλάστηση τα σπορόφυτα μολύνθηκαν μηχανικά όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

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

Αποτελέσματα

Όλες οι ποικιλίες μολύνθηκαν (Πίνακας 3) εμφανίζοντας τα τυπικά συμπτώματα του BCMV: παραμορφώσεις, μεταχρωματισμός και μικροφυλλία, (Εικόνες 6,7 και 8).

Πίνακας 3. Αντίδραση ποικιλιών εμπορίου στη μηχανική μόλυνση με τον BCMV.

Ποικιλίες φασολιάς	Εμφάνιση συμπτωμάτων
ΑΙΧΕ χαμωτό	+
Γαζανό	+

Μπαρμπούνι	+
Ρεθεμιωτάκι	+
Borloto	+
Μπαρμπούνια Β'	+
Άσπρο Ε'	+
Γιγαντάκια	+
Πυλιάρικο	+
Βουλγαρίας	+
Μαυρομάτικο	+
Atlanta	+
Majirus	+
Ασπροκόλια Α'	+
Ασπροκόλια	+

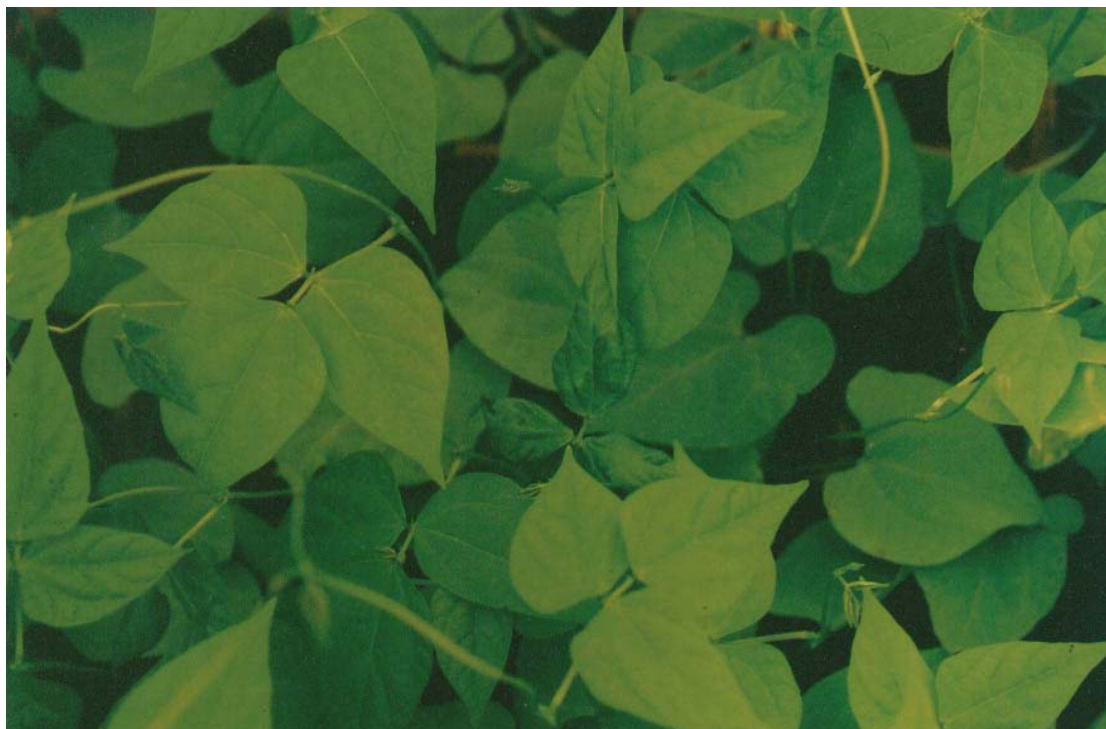
Από τα συμπτωματικά φυτά 3 έως 4 από κάθε ποικιλία μεταφέρθηκαν σε σκιαζόμενο τμήμα αγρού (shadehouse) για την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου προκειμένου να συλλεχθεί ο σπόρος.



Εικόνα 6. Έντονες παραμορφώσεις και μωσαϊκό με φλύκταινες, αποτελέσματα προσβολής του BCMV σε σπορόφυτο ποικιλίας *Borloto*.



Εικόνα 7. Συμπτώματα έντονου μωσαικού με φλύκταινες σε φύλλα ποικιλίας Μπαρμπούνια 25 ημέρες μετά την μόλυνση με τον BCMV.



Εικόνα 8. Συμπτώματα προσβολής του BCMV σε σπορόφυτο ποικιλίας Γαζανό

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

**ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΠΟΡΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ
ΦΑΣΟΛΙΟΥ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΜΕ ΤΟΝ BCMV**

Εισαγωγή

Επειδή ο BCMV είναι ένας σπορομεταδιδόμενος ιός της φασολιάς θεωρήθηκε χρήσιμο να μελετηθεί η συμπεριφορά ορισμένων τοπικών ποικιλιών στη δυνατότητα μόλυνσης των σπόρων. Παράλληλα διερευνήθηκε η αξία της εφαρμογής της δοκιμής ELISA στην ανίχνευση του ιού τόσο στο σπόρο, όσο και στο σπορόφυτο αμέσως μετά τη βλάστηση προκειμένου να αντικατασταθεί η χρονοβόρα δοκιμή του seedling test σε ιολογικούς ελέγχους σπορομερίδων.

1. Προέλευση σπόρου

Οι σπόροι προήλθαν από τις μολυσμένες με τον BCMV ποικιλίες Μαλλιωτάκια, Μπαρμπούνια Β', Άσπρο Ε', Borloto, Ρεθεμιωτάκια και Γιγαντάκια, τις οποίες είχαμε μεταφυτέψει στο σκιαζόμενο τμήμα αγρού. Η προετοιμασία των σπόρων, περιελάμβανε την συγκέντρωσή τους από κάθε φυτό ξεχωριστά και την παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον τρεις μήνες.

Η παρουσία του BCMV στους σπόρους προσεγγίστηκε είτε στα σπορόφυτα που προέκυψαν αμέσως μετά τη σπορά, είτε στο έμβρυο του σπόρου αξιοποιώντας τη δοκιμή ELISA.

2. Δοκιμή DAS - ELISA

Χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικό σκεύασμα της εταιρίας ADGEN Agrifood Diagnostier, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του BCMV και ακολουθήθηκε ακριβώς η μεθοδολογία που συνιστούσε η εταιρία. Τόσο η γ-ανοσοσφαιρίνη, όσο το σύζευγμα (γ-ανοσοσφαιρίνη+ αλκαλική φωσφατάση)

αραιώθηκαν σε αναλογία 1:1000 και 1:500 αντίστοιχα, ενώ το υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε στο 1 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 τουλάχιστον 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 1:10 (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 (μολυσμένο) και αρνητικό (υγιή) 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. Διατήρησή της πλάκας σε θερμοκρασία σκοτεινού δωματίου για 1 ώρα τουλάχιστον.
13. Μέτρηση της πλάκας στο φασμαφωτόμετρο στα 405nm.

3. Έλεγχος Σποροφύτων

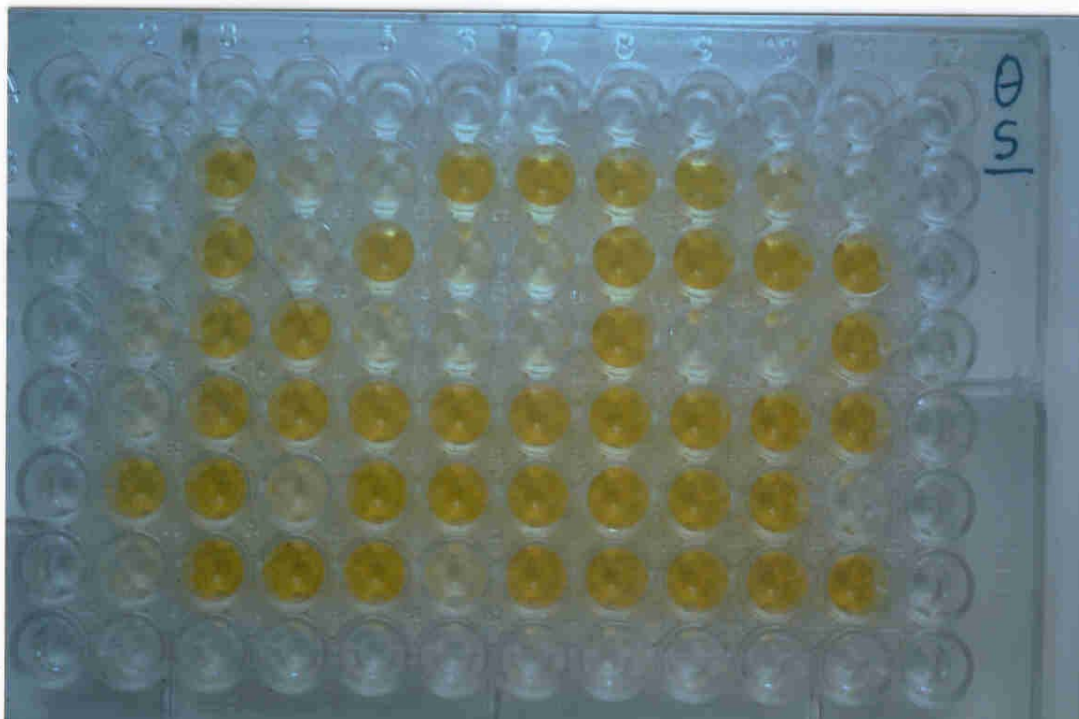
Μέρος από τους σπόρους που είχαν συλλεχθεί από κάθε φυτό, φυτεύτηκαν σε πλαστικούς δίσκους των 80 θέσεων και παρέμειναν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ και υγρασία 70%) μέχρι την έκπτυξη του πρώτου αληθινού φύλλου (Εικόνα 9).

Από κάθε σπορόφυτο κόπηκε η κορυφή με τα φύλλα και ομογενοποιήθηκε σε απολυμασμένο γουδι πορσελάνης, παρουσία περίπου 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο, σε δοκιμαστικούς σωλήνες, μέχρι την τοποθέτησή τους στην πλάκα για την πραγματοποίηση του ελέγχου, όπως περιγράφεται παραπάνω.

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 πιστοποιείται η παρουσία του BCMV (Εικόνα 10).



Εικόνα 9. Σπορόφυτα ποικιλίας Μπαρμπούνια λίγο πριν της δειγματοληψίας για τον έλεγχο της παρουσίας του BCMV με τη δοκιμή ELISA.



Εικόνα 10. Πλάκα ELISA στο στάδιο της ανάλυσης στο φασματοφωτόμετρο (οι κίτρινες κυψελίδες περιέχουν τα μολυσμένα δείγματα).

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα ανίχνευσης του ιού BCMV σε σπορόφυτα φασολιάς με τη δοκιμή ELISA παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα ανίχνευσης του BCMV σε σπορόφυτα φασολιάς με τη δοκιμή ELISA.

Ποικιλίες	Αριθμός	Αριθμός	Ανίχνευση του
-----------	---------	---------	---------------

	Σπόρων	Σπορόφυτων	BCMV
Μαλλιωτάκια	195	133	50 (37,5%)
Μπαρμπούνια Β'	100	95	55 (58%)
Άσπρο Ε'	104	94	29 (31%)
Borloto	104	74	23 (31%)
Ρεθεμιωτάκια	112	84	4 (4,8%)
Γιγαντάκια	98	44	0

Παρατηρούμε ότι τέσσερις ποικιλίες (Μαλλιωτάκια, Μπαρμπούνια Β', Άσπρο Ε' και Borloto) εμφανίζουν ποσοστά προσβολής επιδημιολογικά πολύ υψηλά, που η ενδεχόμενη χρήση τους για σπορά θα οδηγούσε σε αποτυχία της καλλιέργειας.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ποικιλία Γιγαντάκια δεν έδωσε κανένα σπορόφυτο μολυσμένο, φαινόμενο που μπορεί να ερμηνευθεί ως έκφραση ανθεκτικότητας (η μη μόλυνση του σπόρου) έναντι του BCMV. Η ποικιλία Ρεθεμιωτάκια με μικρό ποσοστό μόλυνσης, που πιθανώς να οφείλεται στην έκφραση επίσης ανθεκτικότητας όπως στα Γιγαντάκια, αλλά περιορισμένη ίσως εξαιτίας μεγαλύτερης γενετικής ποικιλότητας της σπορομερίδας που μελετήθηκε.

4. Έλεγχος Σπόρων (έμβρυο)

Ο δεύτερος έλεγχος αφορούσε στον έλεγχο μέρους σπόρων που είχαν συλλεχθεί από τα φυτά τριών ποικιλιών (Μαλλιωτάκια, Μπαρμπούνια Β' και Ρεθεμιωτάκια). Οι σπόροι πριν τη δοκιμή παρέμειναν στο νερό για 24 ώρες. Στη συνέχεια αφαιρέσαμε το έμβρυο από κάθε σπόρο για την πραγματοποίηση του ελέγχου.

Τα έμβρυα ομογενοποιήθηκαν σε απολυμασμένο γουδί πορσελάνης παρουσία ρυθμιστικού εξαγωγής (1 ml). 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 σποροφύτων (Βλέπε παράρτημα).

Αποτελέσματα

Συνολικά ελέγχθηκαν με την δοκιμή DAS-ELISA, 260 έμβρυα μεμονωμένα. Τα αποτελέσματα της δοκιμής παρουσιάζονται συνολικά στον Πίνακα 5. Παρατηρούμε ότι το ποσοστό ανίχνευσης του BCMV είναι ανάλογο με εκείνο που παρατηρήθηκε στη δοκιμή του ελέγχου των σποροφύτων. Επομένως η δοκιμή στο έμβρυο θα πρέπει να προτιμηθεί καθόσον αποφεύγεται η χρονοβόρα διαδικασία της σποράς – βλάστησης των σπόρων.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα ανίχνευσης του BCMV σε έμβρυα σπόρων φασολιάς με τη δοκιμή ELISA.

Ποικιλίες	Αριθμός Εμβρύων	Ανίχνευση του BCMV
Μαλλιωτάκια	100	59
Μπαρμπούνια Β'	100	54
Ρεθεμιωτάκια	26	4

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρατίθενται:

- A. Δελτίο Ελέγχου σπόρων (έμβρυο) της 18/11/2002.
- B. Τιμές απορρόφησης της πλάκας ELISA στο UV (A_{405}) του Δελτίου Ελέγχου (A).

Γ. Σχηματική παράσταση της ανάλυσης του Δελτίου Ελέγχου (Α) με καταγραφή των θετικών και αρνητικών δειγμάτων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια προκύπτει ότι :

- Ο ιός του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς δεν φαίνεται να είναι διαδομένος στις τοπικές ποικιλίες φασολιάς του Οροπεδίου Λασιθίου,

τουλάχιστον όπως προέκυψε από τον ιολογικό έλεγχο έξι (6) ποικιλιών και 6.000 συνολικά σπόρων φασολιάς.

- Ο ιός που απομονώθηκε σε λίγα σπορόφυτα της ποικιλίας Μαλλιωτάκια, αξιοποιώντας κλασικές και σύγχρονες τεχνικές διάγνωσης και ταυτοποίησης, χαρακτηρίστηκε ως μια απομόνωση του ιού του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς.

- Η αξιολόγηση της συμπεριφοράς 15 ποικιλιών φασολιάς που καλλιεργούνται στην Κρήτη, τοπικές και εισαγωγής, έναντι μηχανικών μολύνσεων του BCMV έδειξε ότι όλες έχουν ευπάθεια στη συγκεκριμένη απομόνωση του ιού από το Οροπέδιο Λασιθίου.

- Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της δυνατότητας σπορομετάδοσης της συγκεκριμένης απομόνωσης του ιού σε έξι (6) ποικιλίες, έδειξαν ότι τουλάχιστον οι 5 από αυτές μεταφέρουν την ίωση στους απογόνους τους με ποσοστά που κυμαίνονται από 5-58%.

- Από τη μελέτη προέκυψε ένα αξιοσημείωτο γεγονός: η τοπική ποικιλία Γιγαντάκια μολονότι μολύνεται και εκδηλώνει συμπτώματα στα φύλλα δεν επέτρεψε τη σπορομετάδοση του ιού, φαινόμενο που οφείλεται σε πιθανή έκφραση ανθεκτικότητας έναντι του BCMV της συγκεκριμένης ποικιλίας.

- Ο ιολογικός έλεγχος των σπόρων μπορεί να συντομευτεί σημαντικά αξιοποιώντας τη δοκιμή ELISA και χρησιμοποιώντας το έμβρυο του σπόρου. Αυτό καθιστά τον έλεγχο ταχύτερο και οικονομικότερο.

- Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο BCMV εκτός από σπορομεταδιδόμενος είναι και αφιδομεταδιδόμενος (επομένως αρκεί ένα μικρό ποσοστό μολυσμένων σπόρων για να δημιουργηθούν συνθήκες μαζικής προσβολής των φυτών στον αγρό), η χρησιμοποίηση υγιούς σπόρου αποτελεί βασικό κανόνα περιορισμού των ζημιών στις υπαίθριες καλλιέργειες φασολιάς.

- Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης εκτός του ότι ανέδειξαν το πρόβλημα του σημαντικότερου σπορομεταδιδόμενου ιού της φασολιάς, παράλληλα παρουσίασαν και τις δυνατότητες αξιοποίησης των υποδομών και μέσων που θα οδηγούσε στην αντιμετώπιση του προβλήματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bean common mosaic potyvirus. 1996. IN : Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database (A.A.Brunt, K.Crabtree, M.J.Dallwitz, A.J.Gibbs and L.Watson), 177-181.

- R.I.HAMILTON (1983).

Certification schemes against seed - borne. Viruses in leguminous hosts, present status and further areas for research and development.

Seed Sci & Technol. 11. 1051-1062.

- A.Porta – Puglia, M.Aragona (1997).

Improvement of grain legumes General part : diseases.

Field Crops Research 53. 17-30.

- 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.Virol, 34. 475-483.

- F.J.Morales and L.Bor, 1988.

Bean common mosaic virus. AAB Descriptions of Plant viruses No 337. 6 pp..