

Serie 05SB-1
Enero 1980

EL MOSAICO COMUN DEL FRIJOL

METODOLOGIA DE INVESTIGACION Y TECNICAS DE CONTROL

Francisco José Morales

CIAT
276
1979
c.2

BCMV

NO QUITAR
CARATULA

Centro Internacional de
Agricultura Tropical
CIAT



EL MOSAICO COMUN DEL FRIJOL

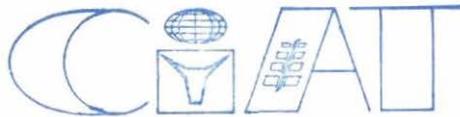
(Bean Common Mosaic Virus)

Metodología de Investigación y Técnicas de Control

por

Francisco José Morales, Ph.D

Virólogo, Programa de Frijol



BIBLIOTECA

10 JUL. 1980

49080

CIAT

Centro Internacional de Agricultura Tropical

Noviembre, 1979

SERVICIOS REFERENCIALES Y BIBLIOTECARIOS

Contenido	Página
Agradecimientos	i
Introducción	ii
Identificación del Virus del Mosaico Común del Fríjol (BCMV)	1
Sintomatología general	1
Transmisión del BCMV por la semilla	1
Transmisión del BCMV por áfidos	2
Transmisión mecánica del BCMV	3
Reacción producida por el BCMV en variedades diferenciales de fríjol	3
Prueba de inducción de lesiones locales	3
Microscopía de luz	4
Microscopía electrónica	4
Observación rápida del BCMV en extractos de tejido	4
Observación de inclusiones del BCMV en cortes de tejido	4
Serología*	5
Purificación del BCMV	5
Espectrofotometría del BCMV	6
Inmunización con el BCMV	6
Prueba serológica con el BCMV	7
Clasificación de cepas del BCMV	8
Mejoramiento genético del fríjol por su resistencia al BCMV	10
Fuentes de resistencia genética al BCMV	10
Incorporación de resistencia al BCMV en cultivares susceptibles	12
Resistencia a las cepas predominantes del virus	12
Resistencia a la infección sistémica crónica	12
Evaluación de material genético de fríjol	13
Secuencia de evaluación	13
Cepas del BCMV usadas en evaluación	16
Control integrado del BCMV	17
Control de insectos vectores	17
Producción de semilla libre del BCMV	19
Métodos de detección del BCMV en la semilla	19
Prueba de germinación	19
Pruebas serológicas	19
Referencias	21

Agradecimientos

El autor agradece al Dr. Francis W. Zettler del Laboratorio de Virus de Plantas de la Universidad de Florida, Gainesville, Fla, su colaboración en los trabajos iniciales de caracterización del virus. También agradece la participación personal del fitomejorador del Programa de Frijol del CIAT, Steven R. Temple, y del Dr. Eelco Drijfhout, genetista-patólogo del Instituto para el Mejoramiento Genético de Hortalizas (IVT), de Wageningen, Holanda, en el diseño de la metodología de evaluación por resistencia a las diversas cepas del virus. Igualmente, el autor reconoce el valioso trabajo de investigación desarrollado por el Dr. Drijfhout, sin el cual nuestro conocimiento sobre la interacción genética entre el Virus del Mosaico Común y el frijol común sería incompleto.

Agradece también al Ing. Mauricio Castaño, asistente de investigación, por su valiosa ayuda en el trabajo de evaluación por resistencia, lo mismo que a la Sra. Patricia Nieto de Calderón, técnica de investigación, por su apoyo en el trabajo de laboratorio. Finalmente expresa su agradecimiento al Ing. Agr. Francisco Motta, M.S., por la revisión y edición del texto y a la Sra. Ligia Milena Suárez por la preparación del mismo.

Introducción

La importancia del cultivo del frijol a nivel mundial, y especialmente en América Latina donde el grano constituye un artículo de producción y consumo, esencial para la población de escasos recursos económicos, ha merecido la creación de programas nacionales dedicados a investigar los factores que limitan la producción de ese cultivo, con miras a su control.

Uno de estos factores limitantes es la incidencia de patógenos causantes de varias enfermedades; entre ellas se atribuye al Mosaico Común prioridad en los programas actuales de mejoramiento genético del frijol, no sólo por la disminución del rendimiento (del orden del 50%) observado en plantas infectadas por el virus, y por su distribución mundial (el virus causal puede ser transmitido a través de la semilla proveniente de plantas infectadas) sino porque ya se han identificado fuentes de resistencia adecuadas para el control de la enfermedad.

El objeto de esta publicación es proporcionar a los investigadores que trabajan en producción del frijol, tanto en el campo como en el laboratorio, una visión general del problema fitopatológico y al mismo tiempo, describirles la metodología que se usó en el CIAT para identificar y manejar el virus y sus cepas durante el proceso de evaluación de materiales de frijol por su resistencia al Virus del Mosaico Común. Esperamos que este trabajo pueda ser asimilado y adaptado por los diferentes programas nacionales para satisfacer sus propias necesidades de mejoramiento genético del frijol común.

Identificación del Virus del Mosaico Común del Fríjol.

Sintomatología general

Los síntomas producidos por el Virus del Mosaico Común (BCMV¹) en el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) son el producto de la interacción establecida entre la planta, el virus y el medio ambiente. Teniendo en cuenta la variabilidad introducida en los síntomas por estos tres factores, se pueden distinguir dos sintomatologías principales en cultivares de frijol infectados por el BCMV: el mosaico y la necrosis sistémica. El mosaico (Figura 1) es la manifestación de la infección sistémica crónica causada por el virus en plantas que posean el tipo de resistencia recesiva originalmente encontrado en el cultivar 'Robust' (13). La necrosis sistémica, conocida también como 'raíz negra' (Figura 2), es el resultado de una reacción de hipersensibilidad con que los cultivares con el tipo de resistencia dominante derivado inicialmente del cultivar 'Corbett Refugee' (17), responden a la infección sistémica producida por algunas cepas del BCMV.

Un síntoma característico del mosaico es la presencia de áreas de color verde oscuro bien definidas sobre un fondo verde claro, que se distribuyen irregularmente sobre la lámina foliar a lo largo de las nervaduras (Figura 1). Este síntoma del mosaico puede también ir acompañado por otros tales como el enrollamiento (Figura 3) y el ampollamiento (Figura 4) de las hojas. Además, es posible que persista la infección sistémica en un cultivar sin que se manifieste ninguno de estos síntomas.

La necrosis sistémica se caracteriza por el deterioro rápido o gradual del sistema vascular de las hojas trifoliadas más jóvenes (Figura 5). La necrosis se extiende luego al resto de la lámina foliar y, en forma descendente, al sistema vascular de toda la planta incluyendo las vainas (Figura 6), las cuales exhiben, a veces, lesiones necróticas locales (Figura 7).

Transmisión del BCMV por la semilla

La capacidad que tiene el BCMV para transmitirse en algunas de las semillas provenientes de una planta infectada por este virus, es una característica útil para su

¹ Bean Common Mosaic Virus. Para facilitar su identificación en cualquier idioma, se usan comúnmente las iniciales del nombre inglés de este virus.

identificación. Hay que anotar, sin embargo, que sólo las plantas que posean resistencia de carácter recesivo, pueden transmitir el virus por la semilla (5).

En algunos casos, el BCMV puede ser identificado en plántulas nacidas de semilla infectada una vez que las hojas primarias hayan aparecido (Figura 8). En la mayoría de los casos, sin embargo, los síntomas se observan más claramente en el primero o segundo trifolio de la planta.

El porcentaje de semilla infectada por el BCMV depende tanto del cultivar del frijol de donde procede esa semilla, como de la época en que ocurra la infección. Cuando la planta ha alcanzado el estado de desarrollo en que se inicia la formación de las vainas, es baja la probabilidad de que el virus infecte la semilla (10). El porcentaje de semilla infectada en la mayoría de los cultivares de frijol observados en el CIAT oscila entre un 15 y un 50 por ciento.

El Virus del Mosaico Sureño del frijol (16) y el Virus del Mosaico del Pepino (3) se transmiten también, aunque en menor grado, a las plantas de frijol por la semilla. Los síntomas inducidos por estos virus (deformación severa de las hojas o moteado indefinido y suave) son, casi siempre, distintos a los causados por el BCMV.

Transmisión del BCMV por áfidos

Varias especies de áfidos son vectores del BCMV (2). Como miembro del grupo de los potyvirus (6), el BCMV es transmitido por áfidos en forma no persistente, es decir, el insecto vector puede adquirirlo en 15 a 60 segundos de una planta infectada, y transmitirlo inmediatamente a una planta sana.

Myzus persicae Sulzer es tal vez la especie de áfidos más adecuada para llevar a cabo estudios de transmisión del BCMV, porque puede identificarse y mantenerse con relativa facilidad en varias especies de plantas tales como el pimiento (*Capsicum* spp.). Para efectuar la transmisión del virus, se recomienda usar formas no aladas del áfido (ninfas) y someterlas a un período de abstinencia de una hora, como mínimo, antes de permitirles alimentarse de la planta.

Con una lente de 10 aumentos se puede observar el momento en que el áfido pone su aparato bucal chupador en contacto con la lámina foliar y dirige las antenas hacia atrás, colocándolas contra la superficie dorsal del abdomen. De 15 a 90 segundos después, el áfido ha penetrado la epidermis de la hoja y en ese momento se puede desprender de ella con un pequeño pincel humedecido para trasladarlo a la planta sana que se desee infectar. Se pueden colocar hasta tres áfidos en cada planta sana que se inocula.

Deben inocularse plantas jóvenes, es decir, a la edad en que sus hojas primarias ya han aparecido. Los síntomas se manifestarán de 8 a 15 días después de la inoculación. El Mosaico Sureño del frijol no es transmitido por áfidos sino por ciertas especies de escarabajos (*Coleoptera*).

Transmisión mecánica del BCMV

El BCMV es transmitido mecánicamente con relativa facilidad. Al hacerlo con fines experimentales, se recomienda usar como inóculo las hojas primarias y/o el primer trifolio de plantas que exhiban los síntomas del mosaico, y efectuar la inoculación en las hojas primarias de las plántulas sanas de frijol antes de que aparezca el primer trifolio. El virus también puede aislarse, para inocularlo artificialmente, de plantas que muestren síntomas iniciales de necrosis sistémica.

El tejido de donde se obtendrá el inóculo puede macerarse en agua o en una solución amortiguadora (fosfato de potasio 0.01 M, pH 7.5) hasta obtener una dilución de 1:10 (p/v)¹. El inóculo, que se conservará frío siempre que sea posible, puede aplicarse con un trozo de gaza estéril. Este método evita el uso de productos abrasivos costosos y nocivos como el carborundum y al mismo tiempo, reduce la probabilidad de que las plantas inoculadas se contaminen con otros virus presentes en ellas, porque la gaza puede cambiarse frecuentemente (Figura 9).

Reacción producida por el BCMV en variedades diferenciales de frijol

Como ya se explicó antes, existen dos grupos principales de cultivares de frijol según el tipo de resistencia al BCMV que posean: uno, en el cual el BCMV causa la sintomatología denominada mosaico, y otro, en que el virus se manifiesta como una necrosis sistémica.

En general, siguiendo este criterio en la identificación del BCMV, cualquiera de sus cepas debe causar mosaico en cultivares tales como 'Double White', 'Stringless Green Refugee', 'Bountiful' o 'Red Kidney', pero no en cultivares como 'Widusa', 'Black Turtle Soup', 'Jubila', o 'Top Crop', siempre y cuando los cultivares sean genéticamente puros. En el segundo grupo de cultivares, algunas cepas del BCMV pueden causar necrosis sistémica. Lo importante, sin embargo, es constatar que el BCMV no produzca mosaico en este segundo grupo de cultivares.

Prueba de inducción de lesiones locales

Entre las especies de plantas descritas en la literatura como 'indicadoras' del BCMV (2), la variedad de frijol 'Monroe' parece ser la más adecuada para esta prueba, por los anillos necróticos (Figura 10) que se forman en las hojas inoculadas con varias cepas del virus (15). Estas lesiones locales se observan mejor si la temperatura ambiente oscila entre 16 y 28 C, pudiendo no manifestarse a temperaturas superiores a los 30 C.

¹ v = volumen de cada solvente; p = peso de la muestra de tejido.

Microscopía de luz

Es posible observar, con un microscopio de luz, la presencia del BCMV en una planta de frijol infectada por el virus (4). Esta técnica se basa en la detección de grandes agregados de *proteína*, llamados inclusiones, que aparecen en el citoplasma de las células infectadas (Figura 11).

Para esta prueba, se escoge una hoja que exhiba los síntomas del mosaico, y con la ayuda de pinzas de punta fina, se desprende una franja de 2 a 5 mm de longitud por 1 a 3 mm de ancho de la epidermis que recubre las nervaduras por el envés de la hoja. Para facilitar la observación de las inclusiones, el tejido puede sumergirse en una solución al 5% de Tritón X-100 durante cinco minutos; este tratamiento destruye los plastidios del citoplasma. El trozo de tejido se coloca luego sobre papel secante para remover el exceso de Tritón e inmediatamente se sumerge en una mezcla de una parte de agua, una parte de Calcomina Naranja 2 RS (Direct Orange 102) y ocho partes de verde brillante 'Luxol' (preparado con guanidina de 1,3-di-orthotolyl y con verde ácido 3-C1 42085) por espacio de 15 a 30 minutos (4). Después de la tinción, el tejido se pasa por etanol absoluto (15 a 30 segundos) y luego se monta sobre una lámina portaobjeto en Euparal o bálsamo del Canadá. Se recomienda usar objetivos de inmersión a pesar de que las inclusiones pueden observarse con menor aumento.

Microscopía electrónica.

Observación rápida del BCMV en extractos de tejido

En laboratorios donde existe o se puede contratar un microscopio electrónico, es posible constatar, en menos de 15 minutos, la presencia de partículas de aproximadamente 700 a 800 nm de longitud y de 12 a 15 nm de diámetro, típicas de potyvirus tales como el BCMV (Figura 12).

Para preparar la muestra, se toma una sección de aproximadamente 1 cm² de tejido foliar que ojalá incluya áreas con síntomas de mosaico, se macera en tres gotas de una solución al 2% de ácido fosfotúngstico, pH 6.5, y se deja en suspensión por espacio de 1 a 2 minutos. Luego, con una micropipeta o pipeta Pasteur se coloca una gota de esa preparación sobre una rejilla portamuestras, dejándola reposar durante un minuto antes de secar la rejilla con papel de filtro; finalmente, se observa la muestra en el microscopio electrónico.

Observación de inclusiones del BCMV en cortes de tejido

Esta técnica complementa el método de microscopía de luz en la observación de inclusiones virales. El microscopio electrónico permite, obviamente, una mejor resolución de las inclusiones, facilitando así el diagnóstico del BCMV.

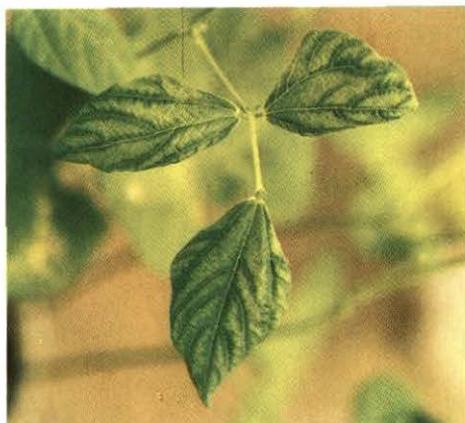


Figura 1



Figura 2



Figura 3



Figura 4



Figura 5

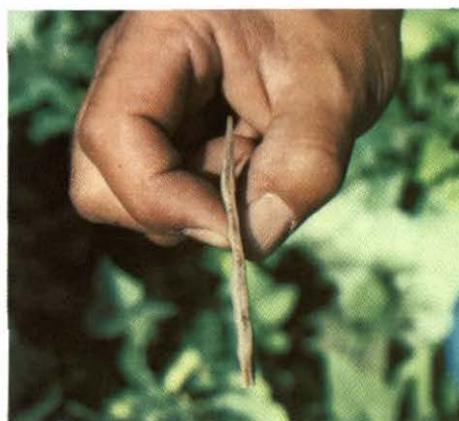


Figura 6



Figura 7



Figura 8



Figura 9

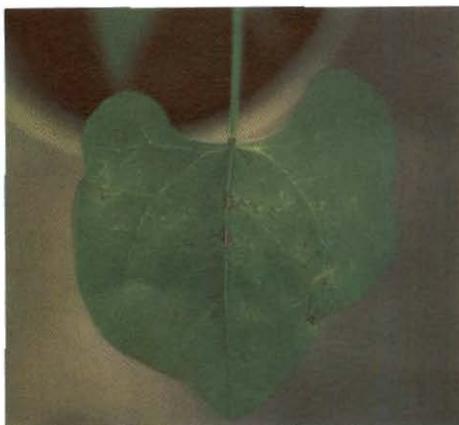


Figura 10

Las inclusiones obtenidas con el BCMV se observan, en cortes ultrafinos de tejido vegetal, como estructuras de apariencia circular, tubular, o radial, constituidas por agragados laminares (Figura 13).

Para desarrollar esta técnica, se necesitan materiales para incluir las muestras en plástico (14) y un ultramicrotomo, además del microscopio electrónico. Este procedimiento, sin embargo, es rutinario en laboratorios de Virología de Plantas y Patología, tanto humana como animal, a donde se pueden llevar muestras con el fin de caracterizar adecuadamente un virus o cepa que se describe por primera vez.

Serología

La serología es la técnica más rápida y confiable para identificar virus de plantas. Para llevar a cabo esta prueba es necesario disponer de un suero específico que se prepara a partir del virus purificado, es decir, separado de los componentes antigénicos normales de la planta de donde se tomó la muestra.

Purificación del BCMV

El método descrito a continuación se divide en dos etapas. La primera, que puede desarrollarse en laboratorios dotados sólo con una centrífuga común de baja velocidad (hasta 12,000 rpm), produce virus parcialmente purificado, con el cual se puede obtener un antisuero de mediana especificidad. La segunda etapa puede complementar a la primera y requiere el uso de una ultracentrífuga con una velocidad de aproximadamente 40,000 rpm, para producir un virus suficientemente puro que permita obtener un antisuero altamente específico.

El tejido vegetal de donde se extraerá el BCMV debe proceder de plantas de una variedad de frijol susceptible al virus, inoculadas en las hojas primarias antes de que emitan el primer trifolio; es recomendable tomarlo de las hojas primarias y del primer trifolio una vez hayan aparecido los síntomas. El tejido cosechado (unos 100 gramos, como mínimo) se homogeneiza durante un minuto en una solución amortiguadora de fosfato potásico 0.5 M, (1:2, p/v), pH 7.5, que contenga 0.5% de sulfito de sodio (Na_2SO_3). Enseguida, se agregan al homogeneizado cloroformo y tetracloruro de carbono (0.5:1, v/p) y se homogeneiza por dos dos minutos más.

Para completar el proceso de clarificación, se somete el volumen homogeneizado a centrifugación (5,000 rpm) durante cinco minutos. El sobrenadante que resulte se trata, entonces, con glicol-polietileno (PEG) al 6.0%, y se agita en frío (4 C) por dos horas. El virus así precipitado se concentra por centrifugación a 8,500 rpm, durante 10 minutos.

El precipitado obtenido se resuspende en fosfato de potasio 0.25M, pH 7.5, y se incuba por espacio de seis horas antes de clarificarlo por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos.

Del sobrenadante se hace precipitar de nuevo el virus añadiendo PEG al 20%, a razón de dos mililitros de esta solución por cinco mililitros del sobrenadante, y se incuba durante una hora en frío (4 C). El precipitado se concentra enseguida por centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos, y se resuspende después en una solución de fosfato de potasio 0.25M, pH 7.5 (0.5 ml de esa solución por cada 100 g de tejido); 12 horas más tarde, se clarifica por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante, que debe quedar tan cristalino como sea posible, contiene el virus con un grado relativo de pureza.

Se obtiene un virus más purificado para inmunizar animales de laboratorio, si el virus parcialmente purificado por el procedimiento anterior se le centrifuga en un gradiente de densidad de cloruro de cesio al 30% (p/p) en solución de fosfato de potasio 0.05M, pH 7.5 (por ejemplo: 34.8 g CsCl en 81 ml de solución), a 36,000 rpm durante 17 horas.

El virus puede ser observado en estos gradientes como una banda, al iluminar los tubos con un haz de luz en un cuarto oscuro (Figura 14). El virus puede recolectarse mediante una jeringa e inmediatamente se concentrará por centrifugación a 36,000 rpm durante 90 minutos (Figura 15). El virus así precipitado, puede ser resuspendido en solución de fosfato de potasio 0.05M, pH 7.5 (0.5 ml de solución por cada 100 mg de tejido homogeneizado).

Espectrofotometría del BCMV

Con el fin de determinar la pureza y la concentración del BCMV, se analiza la suspensión final del virus ya purificado en un espectrofotómetro dentro de una banda de longitudes de onda comprendida entre 240 y 360 nm (luz ultravioleta). Se recomienda usar celdas de un mililitro o menos y diluir la suspensión 20 veces o más.

Una suspensión viral adecuada para producir un antisuero, debe poseer una relación de absorbancia $A_{260/280}$ cercana a 1.25.

Para determinar la concentración aproximada del virus en una suspensión cuya $A_{260/280}$ sea aproximadamente 1.25, se puede aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración del BCMV} = \frac{A_{260} \times \text{dilución}}{2.4} = \text{mg BCMV/ml}$$

Inmunización con el BCMV

El método de inmunización más eficiente, cuando se dispone de cantidades limitadas del virus (por ejemplo: 0.6 ml de una suspensión de 1 mg BCMV/ml), es la inyección de la suspensión viral en las yemas (o almohadillas) de los dedos de las patas traseras de un conejo (18).

Gracias a esta técnica, 200 g de tejido de una planta de frijol infectada son suficientes para aislar, en un solo ciclo de purificación, el virus necesario para obtener un antisuero. La rutina de inmunización consiste en la aplicación de cuatro inyecciones, de 0.15 ml cada una, de una suspensión viral (1 mg/ml). Las inyecciones se emulsifican con un volumen igual de adyuvante de Freund, completo para la primera inyección e incompleto para las restantes. Las tres primeras inyecciones se pueden administrar con una semana de intervalo, y la última, un mes después de la tercera inyección.

Se puede empezar a sangrar el conejo una semana después de la tercera inyección teniendo cuidado de privar de comida al conejo por lo menos seis horas antes de la sangría. La sangre (hasta 30 ml) puede colectarse en un tubo de ensayo y se lleva luego a un baño de agua a 37 C por 45 minutos. Inmediatamente después, se centrifuga el tubo a 2,000 rpm durante 10 minutos y se somete el sobrenadante de nuevo a centrifugación por 10 minutos a 5,000 rpm. El antisuero obtenido (sobrenadante) se transfiere a varios frascos pequeños (1 ml) y se congela hasta el momento en que deba usarse.

Prueba serológica con el BCMV

Aunque existen numerosas pruebas de serología (1), la prueba de difusión doble (Ouchterlony) en medio de agar es la más recomendable para la identificación del virus (11).

Con el BCMV la prueba se desarrolla de la siguiente manera:

Preparación del medio

A 4 g de Agar Noble se añaden 300 ml de agua destilada; el recipiente se coloca en agua caliente para disolver el agar, que una vez disuelto, se esteriliza en el autoclave a 121 C (250 F) durante cinco minutos. Cuando esté tibio, se agregan al agar 5 g de azida de sodio (NaN_3), agitando hasta disolverla.

Al mismo tiempo, se disuelven 2.5 g de sulfato de dodecilo de sodio (SDS) en 150 ml de agua destilada caliente y se agregan al agar; se completa el volumen a 500 ml con agua destilada agitando constantemente. Del medio así preparado se vacían en platos de Petri plásticos (o de vidrio tratados con Formvar) unos 12 ml por plato, teniendo cuidado de hacerlo sobre una superficie nivelada. Una vez llenos, los platos se pueden guardar en la nevera (el SDS se precipita en frío, pero a temperatura ambiente, el medio se aclara de nuevo).

Preparación de la prueba serológica

El arreglo de las muestras y del antisuero en los platos se ilustra en la Figura 16. Para hacer los pozos en el agar se recomienda usar un sacabocado de borde bien cortante, de unos 3 a 4 mm de diámetro. Los pozos en que se colocan las muestras deben estar separados unos 4 ó 5 mm del pozo central que contiene el antisuero. Para preparar una muestra, se macera aproximadamente 1 mg de tejido vegetal en una mezcla de 1 ml de

agua y 1 ml de una solución al 3% de SDS. Al descongelar el antisuero se usa como está. Una vez colocados los reactivos en el plato, éste se deja a temperatura ambiente, o mejor, en una cámara húmeda a 24 C por un período de aproximadamente 20 horas. La reacción de precipitación entre el virus y sus anticuerpos específicos se manifiesta como una línea semicircular en el área que separa sus pozos respectivos (Figura 16).

Siempre se deben incluir, como testigos, extractos de plantas que no estén infectadas para comprobar que el antisuero no reacciona con proteínas de la planta, lo que puede esperarse si el antisuero se obtuvo a partir del virus parcialmente purificado. En ese caso, se recomienda llenar primero el pozo donde se pondrá el antisuero con extracto de una planta de frijol sana, ojalá de la misma variedad que se inoculó para extraer y purificar el virus (no debe usarse SDS al preparar este extracto) y dejarlo así durante unas ocho horas; enseguida, se retira ese extracto y se colocan, en sus respectivos pozos, el antisuero y las muestras. Procedimientos más complejos para neutralizar anticuerpos no específicos al virus, presentes en antisueros contaminados, han sido ya descritos (12).

Conviene anotar que extractos de semilla de frijol no pueden ser analizados con la prueba serológica, debido a su alto contenido de componentes hemaglutinantes que causan reacciones no específicas con los ingredientes de los medios usados en la prueba. Esas reacciones no específicas se manifiestan generalmente como bandas anchas que, a veces, ocupan todo el espacio que separa, en el agar, el pozo del antígeno (la muestra) y el del antisuero. Más adelante (pág. 19) se describe una técnica serológica adecuada para detectar el BCMV en la semilla.

Clasificación de cepas del Virus del Mosaico Común del Frijol

Una vez identificado el BCMV como agente causal de la enfermedad, se procederá a determinar la cepa del virus según su patogenicidad, luego de ser inoculado en varios grupos diferenciales de cultivares de frijol (5). La reacción de estos cultivares diferenciales a las cepas estudiadas del BCMV se describe en el Cuadro 1.

Es aconsejable inocular por lo menos dos veces los diferenciales con la cepa que se desea identificar, para confirmar su patogenicidad y disminuir así el riesgo de estar inculando inadvertidamente mezclas de cepas. Los cultivares diferenciales de los grupos 7 a 9 deben ser mantenidos a temperaturas entre 26 y 30 C para detectar ciertas cepas que inducen en ellos la necrosis sistémica.

Los cultivares que no exhiban síntomas después de la inoculación, deben ser sometidos a una prueba serológica o a una prueba de infectividad con el fin de excluir la posibilidad de que el virus se encuentre en ellos en forma latente. Para practicar la prueba de infectividad, se toma una hoja joven de cada planta inoculada que no haya desarrollado síntomas, se macera y con el extracto se inculca una variedad susceptible del grupo 1.

Cuadro 1. Clasificación de cepas del virus del Mosaico Común del frijol.

Grupo	Cultivar Diferencial	Cepa del BCMV									
		Tipo	Fla	NY15	NL2	NL3	NL4	NL5	NL6	NL7	NL8
Cultivares I⁺I⁺											
1	Double White	+ ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Stringless Green Refugee	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Redlands Green Leaf C		+	+v	+	+v	+	+	+	+	+
	Puregold Wax		+	+v	+	+v	+	+	+	+	+
	Imuna		+	+v	+	+v	+	+	+	+	+v
3	Redlands Green Leaf B		+			+	+	+	+		
	Great Northern 123		+			+v	+	+v	+		
4	Sanilac			+	+	+		+			+
	Michelite 62			+	+	+		+			+
	Red Mexican 34			+	+	+		+			+
5	Pinto 114			+	+	+		+			
6	Monroe							+			
	Great Northern 31							+			
	Red Mexican 35							+			
Cultivares II											
7	Widusa					+		+		+t	
	Black Turtle Soup					+		+		+t	
8a	Jubila				+t	+		+		+	
8b	Top Crop				+t	+		+		+t	
	Improved Tendergreen				+t	+		+		+t	
9	Amanda							+			

¹ Reacción al BCMV: + = mosaico en cultivares I⁺I⁺ o necrosis sistémica en cultivares II; +v = síntomas variables y poco evidentes con infección sistémica; +t = necrosis sistémica a temperaturas altas. (E. Drijfhout).

Una vez identificadas las cepas, es recomendable mantenerlas en la semilla de los diferenciales específicos de cada cepa. Por ejemplo, la cepa Florida se conservará en cultivares del grupo 2 ó 3; la Nueva York 15, en cultivares del grupo 4 ó 5; y la NL4, en cultivares del grupo 6. Las cepas necróticas, obviamente, deben ser preservadas en cultivares en los cuales causen mosaico.

En cuanto se refiere al nombre de las cepas, es preferible adoptar sus nombres comunes (Florida, Tipo, Nueva York 15) y/o el número NL (Cuadro 1) mientras se llega a un acuerdo definitivo sobre nomenclatura.

Mejoramiento genético del frijol para intensificar su resistencia al Virus del Mosaico Común

Puesto que controlar la diseminación del BCMV por áfidos o por la semilla de frijol infectada es una labor difícil, la incorporación de resistencia a este virus ha sido uno de los métodos de control más favorecidos.

Fuentes de resistencia genética al Virus del Mosaico Común

La resistencia al BCMV en *P. vulgaris* está condicionada, según Drijfhout (5), por genes no específicos (bc-u), por genes específicos contra ciertas cepas del virus (bc-1, bc-2 y bc-3) y principalmente, por el gen dominante I que condiciona la reacción de la planta a ciertas cepas del virus conocida como necrosis sistémica. La forma homocigota recesiva de este gen, I⁺I⁺, permite la infección sistémica crónica de la planta por cepas patógenas.

El genotipo de los diferentes grupos de cultivares diferenciales de frijol aparece en la Tabla 2 junto con los genes de patogenicidad de las cepas del BCMV (5).

Cuadro 2. Interacción genética entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* y cepas del Virus del Mosaico Común del frijol

Cultivar Diferencial	Genes de Resistencia	Cepa BCMV y genes de patogenicidad						
		Tipo PO	Fla-NL6 PI. I ²	NY15-NL2 P1.2	NL3-NL5 P1.1 ² .2	NL4 P1.1 ² .2 ²	NL7 P1	NL8 P2
Double White	I ⁺	+	+	+	+	+	+	+
Imuna	I ⁺ bc-u bc-1		+	+	+	+	+	
RG-B	I ⁺ bc-u bc-1 ²		+		+	+		
Michelite	I ⁺ bc-u bc-2			+	+			+
Pinto 114	I ⁺ bc-u bc-1 bc-2			+	+			
GN 31	I ⁺ bc-u bc-1 ² bc-2 ²					+		
Widusa	I		+		+			+
Jubila	I bc-1		+	+	+			
Top Crop	I bc-1		+	+	+			
Amanda	I bc-1 ²				+			



Figura 11



Figura 12



Figura 13

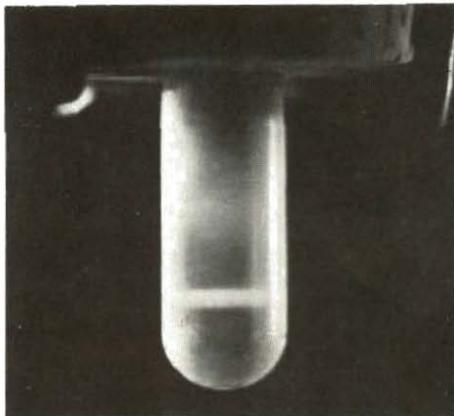


Figura 14

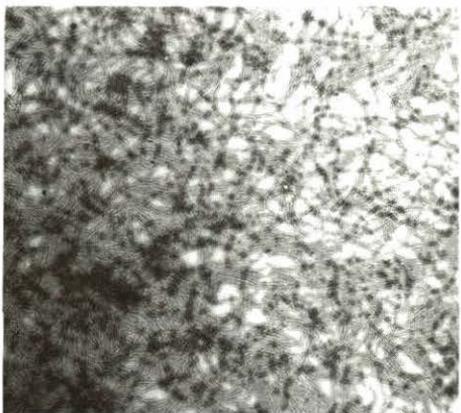


Figura 15

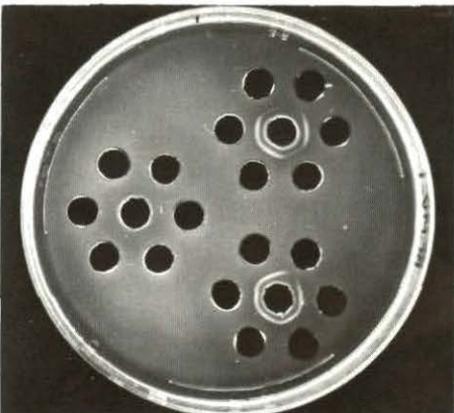


Figura 16

Incorporación de genes de resistencia al Virus del Mosaico Común en cultivares susceptibles

Existen, básicamente, dos métodos de incorporar resistencia genética al BCMV en cultivares de frijol susceptibles al virus: primero, introduciendo genes recesivos específicos contra una cepa determinada del BCMV y segundo, por adición del gen I de necrosis, que excluye la infección sistémica crónica por cualquiera de las cepas del BCMV.

Búsqueda de resistencia genética a las cepas predominantes del Virus del Mosaico Común

Alcanzar este objetivo supone un estudio a fondo de las cepas del BCMV existentes en el área de interés donde se cultiva frijol, así como un control estricto de la calidad fitosanitaria de la semilla que se siembre en esa región. Por ejemplo, si se comprobara que la única cepa del BCMV presente en una región es la Tipo, se podrían usar, en proyectos de mejoramiento, los cultivares de los grupos 2 a 6 como padres resistentes.

Desafortunadamente, no existe en el momento ningún programa o entidad nacional que posea la tecnología adecuada para prevenir la introducción de nuevas cepas del BCMV en semilla infectada. Este hecho, sumado a la diseminación natural de cepas del BCMV por insectos vectores, resta trascendencia a los proyectos de incorporación de resistencia de tipo recesivo a las cepas predominantes del BCMV.

Búsqueda de resistencia genética a la infección sistémica crónica causada por cepas del Virus del Mosaico Común

La incorporación del gen I que previene la infección sistémica crónica (la que se manifiesta generalmente como mosaico en las plantas que no poseen este gen), es uno de los objetivos más codiciados en los programas actuales de mejoramiento del frijol. Este gen dominante previene también la infección de la semilla y, por lo tanto, la transmisión del BCMV por semillas infectadas.

A pesar de que existen cepas del BCMV llamadas "necróticas" por su capacidad de inducir necrosis sistémica en presencia del gen I, la experiencia de campo en países donde existen estas cepas indica que su incidencia en las épocas de cultivo de frijol es casual, y por consiguiente, no reviste ninguna importancia económica.

Existen, además, dos métodos para controlar las cepas "necróticas" del BCMV. El primero consiste en el control de su transmisión por semilla al sembrar solo cultivares I resistentes; en otras palabras, no es conveniente cultivar variedades de frijol susceptibles a la infección sistémica (gen I⁻) junto con variedades resistentes (gen I), para eliminar así las fuentes de cepas necróticas e impedir su transmisión por insectos vectores a plantas que posean el gen I.



Figura 17,a



Figura 17,b



Figura 18



Figura 19,a

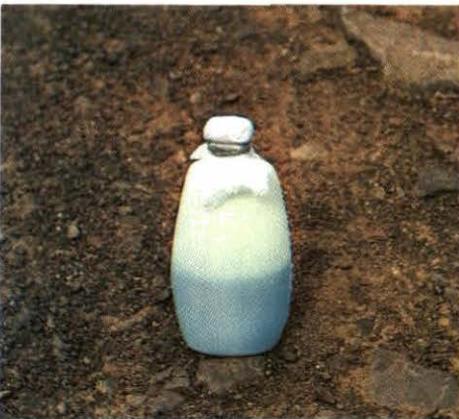


Figura 19,b



Figura 20



Figura 21

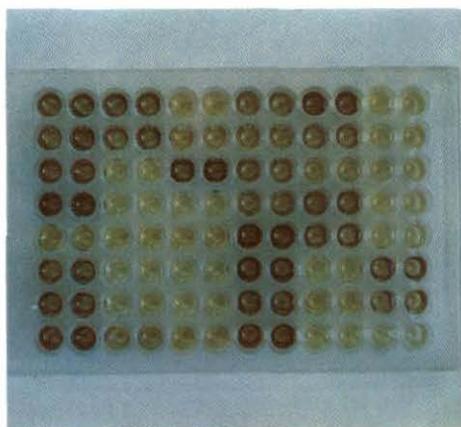


Figura 24

El segundo método de control se funda en la incorporación de genes específicos de resistencia a cepas “necróticas” del BCMV en materiales que posean el gen I. Este objetivo ya ha sido logrado en el caso de la variedad de frijol IVT 7233, producida en Holanda (5), que es resistente a todas las cepas conocidas del BCMV. Posiblemente, el genotipo que posee esta variedad (I bc-1² bc-2²) es una combinación del gen I de necrosis con los genes específicos de resistencia a cepas necróticas del BCMV, obtenidos del grupo de cultivares al que pertenecen el “Great Northern 31” (Cuadro 2). Esa variedad, sin embargo, no está adaptada al Trópico.

Evaluación de cultivares y materiales de mejoramiento genético por su resistencia al Virus del Mosaico Común del Frijol

La evaluación de variedades de frijol por su resistencia al BCMV está sujeta al tipo de resistencia que se desee incorporar, a saber: genes específicos de resistencia o el gen I de necrosis sistémica. En ambos casos se debe desarrollar una metodología efectiva de inoculación y evaluación con el fin de detectar el mayor número de plantas susceptibles a la cepa o cepas del BCMV que se quiera controlar.

Generalmente, los métodos de inoculación mecánica, como el explicado anteriormente (pág. 3), son los más eficaces. Sin embargo, en regiones donde la incidencia de insectos vectores (áfidos) sea alta y constante durante ciertas épocas del año, se puede evaluar los materiales para mejoramiento en condiciones naturales de campo. Lo más acertado sería una combinación de los dos métodos de inoculación, el manual y el natural.

Secuencia de evaluación de materiales parentales y de sus progenies

Se debe conocer, ante todo, el tipo de resistencia presente en las variedades seleccionadas como padres resistentes, con el fin de seleccionar los progenitores deseados y facilitar el manejo y la interpretación de los resultados obtenidos en la evaluación de progenies.

Gracias al proyecto cooperativo acordado entre el CIAT y el Instituto para el Mejoramiento Genético de Hortalizas (IVT) de Wageningen, Holanda, se ha determinado el tipo de resistencia presente (dominante o recesiva) en varios cultivares comúnmente usados como padres en programas de mejoramiento genético. Esa información se obtuvo inoculando plantas de frijol con cepas diferenciales del BCMV, incluyendo las “necróticas”, para confirmar la presencia de los alelos recesivos (mosaico) o dominantes (necrosis sistémica) del gen I. Para detectar el gen I, se efectúa una ‘prueba de necrosis’ que consiste en inocular una hoja primaria o un folíolo del tercero o cuarto trifolio de la planta con una cepa necrótica. La hoja inoculada se coloca en cámara húmeda a una temperatura de 27 a 30 C por cuatro o cinco días, con el fin de detectar la presencia de necrosis en las venas de las hojas de aquellos materiales que posean el gen I (Figura 17, a y b).

La inoculación y/o la evaluación deben empezar en la generación F_2 , puesto que la F_1 de un cruce entre dos plantas que posean resistencia de tipo recesivo, una resistente y la otra susceptible a una cepa del BCMV, será susceptible. Igualmente, la F_1 de un cruce entre una planta que posea el gen I y otra susceptible a mosaico (gen I^+), será resistente.

Los cuadros 3 y 4 explican la segregación por resistencia al BCMV observada en la F_2 de cruces obtenidos entre dos materiales que poseen resistencia de tipo recesivo ($I^+ \times I^+$), y en la F_2 resultante de una variedad con resistencia recesiva y de otra con resistencia dominante ($I^+ \times I$), respectivamente.

Debido a que la generación F_2 debe también evaluarse, en el campo, respecto a otras características agronómicas distintas a su resistencia al BCMV, existen dos alternativas para su evaluación por resistencia a este virus. La primera, aprovechar la incidencia natural del BCMV transmitido por semilla y por áfidos, con el fin de evaluar sólo aquellas plantas que no muestren síntomas de mosaico, respecto a otras características agronómicas deseables; la segunda, inocular mecánicamente las plantas en el campo. Es posible inocular plantas de poblaciones F_2 en el campo usando los dedos, o mejor aún, un recipiente para dispensar el inóculo como el que se aprecia en las Figuras 18 y 19; sin embargo, esta práctica tiene algunas limitaciones. Una de ellas es el efecto adverso que ejercen sobre el virus factores ambientales como la irradiación solar, la lluvia o la presencia de tierra en las hojas que se inoculen; otra, es la irregular germinación de la semilla que habrá de afectar la homogeneidad de las plantas al momento de la inoculación. En consecuencia, la eficiencia de la inoculación en el campo es menor comparada con la obtenida en invernaderos (Figura 20), o en casas de anejo (Figura 21) donde las plantas están parcialmente protegidas.

Sea cual fuere el proceso de evaluación escogido, es preciso hacer selecciones individuales en poblaciones F_2 para facilitar la detección de líneas susceptibles o segregantes, con respecto al BCMV, en generaciones más avanzadas. La F_3 , por

Cuadro 3. Prueba de la generación F_2 proveniente de cruces entre cultivares que poseen los alelos recesivos (I^+I^+) del gen de necrosis.

Cultivar Susceptible	Cultivar Resistente	Cepa BCMV			
		Tipo S:R ¹	Fla S:R	NY 15 S:R	NL 4 S:R
Double White	Michelite	15:1	15:1	1:0	15:1
Double White	Great Northern 31	57:7	15:1	57:7	1:0
Imuna	Michelite	9:7	3:1	-	3:1
Imuna	Great Northern 31	0:1	3:1	9:7	-

¹ S:R = proporción de plantas susceptibles a resistentes.

Cuadro 4. Prueba de la generación F₂ proveniente de cruces entre cultivares que poseen los alelos recesivos (I⁺I⁺) y cultivares con los alelos dominantes (II) del gen de necrosis.

Cultivar Susceptible	Cultivar Resistente	Cepa BCMV	Segregación ¹				Total Plantas
			S	RI ⁺	NS	RI	
Imuna Michelite	Widusa	Tipo	61	7		249	317
		Tipo	151	18		467	636
		NL 2	92	0		243	335
		NL 4	159	10		479	648
		NL 5	79	0	245	0	324
Imuna Michelite	Top Crop	Tipo	91	20		366	477
		Tipo	136	11		446	593
		NL 2	127	0	11	434	572
		NL 4	128	6		442	576
		NL 5	35	0	117	0	152

¹S = susceptible a infección sistémica; RI⁺ = resistencia a infección sistémica, de carácter recesivo; NS = necrosis sistémica; RI = resistencia a infección sistémica del tipo dominante, positivo en prueba de necrosis.

ejemplo, puede escogerse como la generación en la cual se confirman, mediante inoculación de una muestra representativa de plantas de esa generación, los resultados de la evaluación llevada a cabo en la F₂.

Si se prefiere evaluar la F₂ por otras características agronómicas que no sean su resistencia al BCMV, las progenies F₂ de las selecciones individuales pueden inocularse con el BCMV por primera vez, aprovechando el hecho de que existe mayor probabilidad de descubrir líneas susceptibles o segregantes en la F₃. En tal caso, la muestra inoculada debe contener, como mínimo, 20 semillas por selección.

La inoculación de las líneas F₃ puede practicarse en un invernadero o casa de anejo; al mismo tiempo, la semilla remanente se siembra en el campo para ser sometida a observación y evaluación con respecto a otros factores. Se espera que la resistencia al BCMV esté fija ya en la generación F₄.

Otro método usado en el CIAT para incorporar los alelos dominantes del gen de necrosis (I I) en materiales de frijol susceptibles, ha sido el retrocruzamiento.

En la Figura 22 se diagraman los pasos seguidos hasta lograr la incorporación de los genes I I. En líneas generales, se comienza la labor de retrocruzamiento a partir de la generación F₁ del cruce entre un padre que posee los alelos recesivos (I⁺I⁺) y otro que posee los alelos dominantes (I I) del gen de necrosis, hasta alcanzar la quinta retrocruza, F₁ RC⁵. Durante todo el proceso se inoculan manualmente las progenies

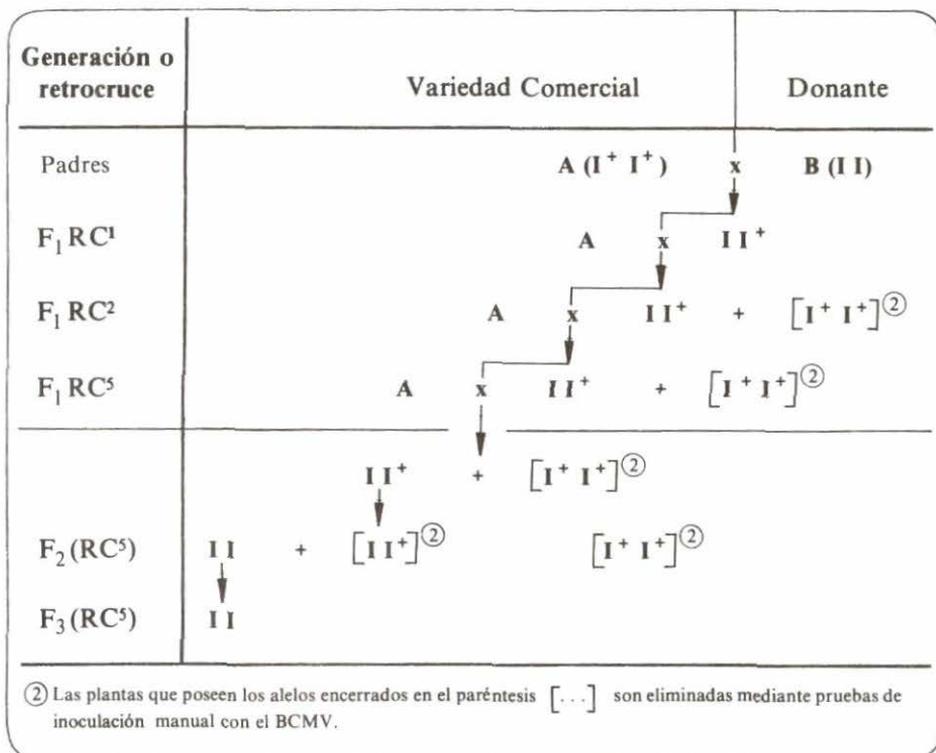


Figura 22. Sistema de retrocruzamiento usado para incorporar resistencia dominante al Virus del Mosaico Común del frijol¹

con el virus a fin de eliminar las plantas susceptibles ($I^+ I^+$). Se obtiene luego la generación F₂ (RC⁵), que se somete a una prueba de progenies para eliminar las plantas heterocigotas (II^+) y homocigotas susceptibles ($I^+ I^+$). Finalmente, se avanza a la siguiente generación, F₃ (RC⁵), a partir de las plantas F₂(RC⁵) homocigotas resistentes (II).

Se recomienda usar una mezcla de las cepas NY 15 y NL 4 del BCMV para eliminar las plantas que posean los alelos recesivos del gen de necrosis ($I^+ I^+$). Además, la variedad comercial susceptible debe ser o el progenitor recurrente o la madre, para detectar mejor posibles casos de autofecundación que, si ocurriera, generaría plantas susceptibles al BCMV.

Cepas del Virus del Mosaico Común usadas en la evaluación genética de materiales

Si un programa de mejoramiento decide introducir resistencia a una cepa determinada del BCMV, deberá usar esa cepa para eliminar las plantas o materiales

¹ Dr. S. R. Temple, Fitomejorador, Programa de Fríjol, CIAT

susceptibles. Por ejemplo, si se busca resistencia a la cepa Tipo del BCMV, se inoculará únicamente con esta cepa. Si por el contrario, se pretende incorporar el gen I a un cultivar susceptible, deberá usarse una mezcla de cepas del BCMV capaces de atacar todas las plantas que no posean el gen dominante de necrosis, I. Dos cepas que cumplirían este requisito son la Nueva York 15 y la NL4 que, en combinación, atacan a todas las plantas de los grupos de cultivares de frijol con resistencia recesiva (gen I⁺) pero no causan necrosis sistémica en plantas que posean el gen I (Cuadro 1).

Para confirmar la presencia del gen I, es necesario efectuar la 'prueba de necrosis' (pág. 13).

En caso de que no existan algunas de las cepas necesarias para lograr los objetivos previstos, se puede evaluar primero la resistencia de los materiales a la cepa predominante del BCMV en la región, adelantando los materiales resistentes respecto a otras de sus características agronómicas deseables. A medida que avanza así una línea, se puede enviar una muestra de su semilla al CIAT o a países donde existan otras cepas del virus, para observar allí el comportamiento de ese material frente al virus. Conviene siempre evaluar 20 semillas provenientes de una selección individual de la última generación.

En la Figura 23 se ilustra un proceso de evaluación cuyo objetivo es incorporar el gen I de necrosis en materiales de frijol susceptibles al BCMV.

Control integrado del Virus del Mosaico Común

La fácil transmisión del BCMV por la semilla de plantas susceptibles infectadas y la abundancia de insectos vectores en la mayor parte de las áreas de producción de frijol, constituyen una amenaza constante de introducción de nuevas cepas del virus, capaces de causar pérdidas de rendimiento.

En especial, la incidencia de cepas 'necróticas' puede incrementarse a medida que se extiende el cultivo de variedades de frijol que posean el gen I dominante, o cuando la demanda del grano en el mercado estimule la siembra de estos cultivares en épocas que coincidan con la presencia de poblaciones altas de insectos vectores.

De estas consideraciones se desprende que la incorporación de resistencia genética al BCMV no es un método exclusivo de control del virus. Mientras existan variedades susceptibles (gen I⁺) en un cultivo de frijol, se debe ejercer un control estricto, tanto sobre la calidad fitosanitaria de la semilla de cultivares susceptibles usada para siembra, como sobre el insecto vector.

Control de insectos vectores

El agente causal del Mosaico Común del Frijol es, como explicamos antes, un virus que puede ser transmitido por áfidos de manera no persistente, es decir, que un áfido

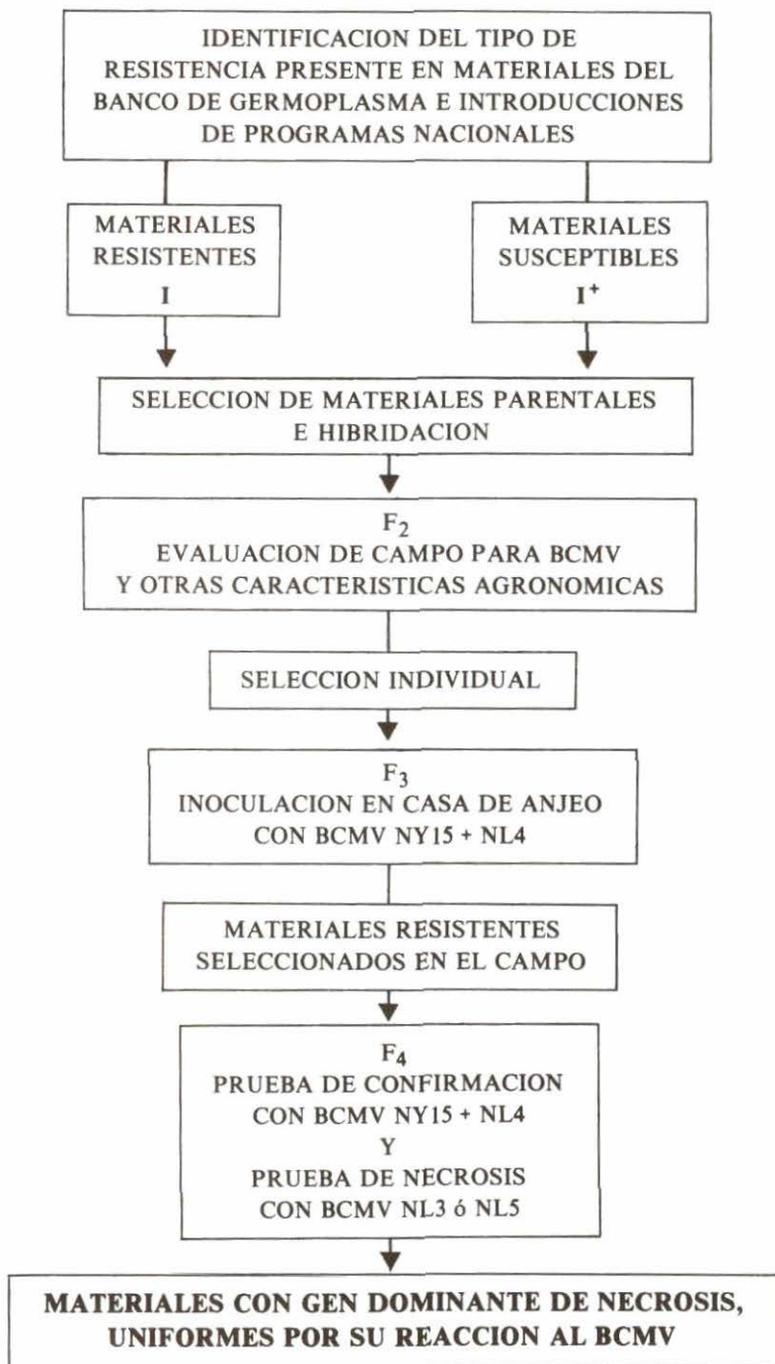


Figura 23. Evaluación de variedades y materiales de mejoramiento genético de frijol por su resistencia al Virus del Mosaico Común

virulífero puede transmitir el virus a una planta sana menos de un minuto después de haber llegado a ésta. Generalmente, los áfidos migran a los campos de frijol desde cultivos diversos, sembrados en lotes vecinos, siendo las formas aladas del insecto las que llegan a las plantas de frijol. Una vez dentro del cultivo, los áfidos pueden transmitir el virus a plantas susceptibles antes de que los insecticidas puedan matarlos. Por lo tanto, un insecticida que trate de prevenir la dispersión del BCMV, sólo será efectivo cuando se aplique a las plantas de donde proceden los áfidos.

El control de los áfidos no tiene que ser químico, si es posible encontrar áreas geográficas con una población baja de áfidos o sembrar frijol en épocas del año en que la ausencia del insecto sea conocida. Sin embargo, la sensibilidad de algunos cultivares de frijol al fotoperíodo y a las variaciones de temperatura, así como la impredecible dinámica de las poblaciones de áfidos, hacen que el control de los insectos vectores del BCMV no siempre sea eficaz.

Producción de semilla de frijol libre del Virus del Mosaico Común

La producción de semilla libre de virus ha sido una medida eficaz de control del BCMV en países como los Estados Unidos, en donde la semilla de variedades de frijol susceptibles al virus se multiplica en regiones alejadas de los cultivos comerciales del grano, en las que no hay áfidos vectores o su población es insignificante. En los países productores de frijol de la zona tropical, por el contrario, los escasos programas de certificación de semilla de frijol se ocupan sólo de su pureza genética, porque carecen de personal calificado y de técnicas de detección del BCMV en la semilla para poder garantizar su calidad sanitaria.

Métodos de detección del BCMV en la semilla

Prueba de germinación

Este método es el más sencillo y barato para establecer la presencia del BCMV en la semilla. Basta sembrar una muestra de semilla lo suficientemente grande para detectar, por lo menos, una semilla infectada en 100 sanas, cuando las plantas manifiesten los síntomas del mosaico en las hojas primarias o en los primeros trifolios.

Entre las limitaciones de este método se pueden citar: la interacción entre cepas del BCMV y algunos cultivares de frijol que resulta en síntomas no visibles; el espacio de invernadero que ocupan las bandejas de siembra, y finalmente, los 15 a 20 días que se requieren para observar los síntomas.

Pruebas serológicas

La serología es una prueba rápida y confiable para la detección del BCMV; no obstante, su aplicación a la detección del virus en la semilla del frijol ha sido

obstaculizada por la presencia de compuestos hemaglutinantes en los extractos de semilla, que producen reacciones no específicas en pruebas serológicas rutinarias. Además, se necesitarían grandes cantidades de materiales para serología y de antisuero para examinar una muestra de semilla estadísticamente significativa, con el agravante de que la mayoría de las pruebas serológicas carecen de la sensibilidad necesaria para detectar el virus si el porcentaje de semilla infectada es bajo.

Recientemente, se ha adoptado la técnica serológica conocida como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)¹ al estudio de los virus de plantas y, particularmente, a la detección de virus en semillas (7, 9). Esta técnica ha permitido, con un gasto mínimo de antisuero, la detección de un embrión infectado con el BCMV que se halle en un grupo de 2,000 embriones sanos (8). La técnica de ELISA ya ha sido adoptada con éxito en el CIAT para detectar el BCMV en la semilla de varios cultivares de fríjol.

La prueba, a grandes rasgos, consiste en adsorber los anticuerpos específicos del virus a una fase sólida (platos desechables de poliestireno para pruebas de microprecipitación), agregar luego la muestra (extractos de semilla) y, por último, los anticuerpos específicos del virus, pero esta vez, conjugados con una enzima. Los anticuerpos conjugados sólo podrían adsorberse en los pozos de la muestra donde haya virus, porque después de la adición de cada reactivo, se lavan los platos para retirar los componentes de las muestras diferentes al virus, y, por consiguiente, los anticuerpos conjugados a la enzima que no encontraron un virus al cual adsorberse.

El resultado final se logra al añadir el sustrato de la enzima, produciéndose una reacción colorimétrica que puede observarse visualmente en aquellos pozos que contenían el virus (Figura 24).

Información más explícita sobre el desarrollo y la aplicación de ELISA u otra de las técnicas trata las en esta guía de investigación puede solicitarse a: Programa de Fríjol, Virología del Fríjol, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia.

¹ Prueba Inmunológica de Adsorción con Conjugados Enzimáticos.

Referencias

1. Ball, E.M. 1974. Serological tests for the identification of plant viruses. Amer. Phytopath. Soc. 31 p.
2. Bos, L. 1971. Bean common mosaic virus. No. 73. *en* Descriptions of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst., Assoc. Appl. Biol., Kew Surrey, England. 4 p.
3. Bos, L., y D. Z. Maat. 1974. A strain of cucumber mosaic virus, seed transmitted in beans. Neth. J. Pl. Path. 80:113-123.
4. Christie, R.G., y J.R. Edwardson. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Fla. Agric. Exp. Sta. Monogr. Ser. 9. 155 p.
5. Drijfhout, E. 1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. 98 p.
6. Fenner, F. 1976. Classification and nomenclature of viruses. Intervirology 7:4-115.
7. Hamilton, R.I., y C. Nichols. 1978. Serological methods for detection of pea seed-borne mosaic virus in leaves and seeds of *Pisum sativum*. Phytopathology 68:539-543.
8. Jafarpour, B. and R.J. Shepherd. 1978. Detection of bean common mosaic virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Phytopath. News 12:172 (Abstr.).
9. Lister, R.M. 1978. Application of the enzyme-linked immunosorbent assay for detecting viruses in soybean seed and plants. Phytopathology 68:1393-1400.
10. Nelson, R. 1932. Investigations in the mosaic disease of bean. Mich. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. 188, 71 p.
11. Purcifull, D.E. y D.L. Batchelor. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions. Fla. Agric. Exp. Sta. Bull. 788, 39 p.
12. Shepard, J.F. 1972. Gel-diffusion methods for the serological detection of potato viruses X, S, and M. Montana Agric. Exp. Sta. Bull. 662, 72 p.

13. Spragg, F.A. y E.E. Down. 1921. The Robust bean. Mich. Agric. Exp. Sta. Spec. Bull. 108, 9 p.
14. Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26:31-43.
15. Trujillo, G.E., y A.W. Saettler. 1972. Local lesion assay of bean common mosaic virus (BCMV) on 'Monroe'. Plant Dis. Repr. 56:714-718.
16. Uyemoto, J.K., y R.G. Grogan. 1977. Southern bean mosaic virus: evidence for seed transmission in bean embryos. Phytopathology 67:1190-1196.
17. Zaumeyer, W.J. 1969. The origin of resistance to common bean mosaic in snap beans. Seed world 105:8-9.
18. Ziemiecki, A., y K. R. Wood. 1975. Serological demonstration of virus-specific proteins associated with cucumber mosaic virus infection of cucumber cotyledons. Physiol. Plant Pathol. 7:171-177.