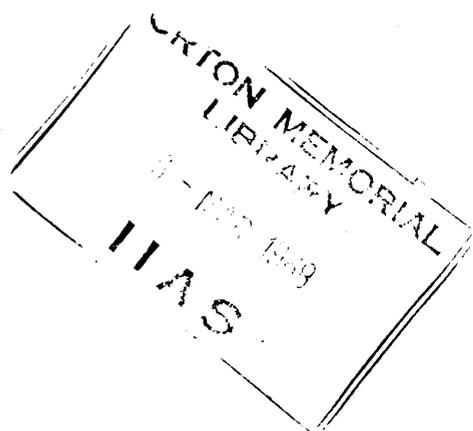


CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL MOSAICO COMUN DEL FRIJOL

(Phaseolus vulgaris L.) EN COSTA RICA



Por

Raúl A. Moreno M.

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.

Centro de Enseñanza e Investigación

Turrialba, Costa Rica

Febrero, 1968

CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL MOSAICO COMUN DEL FRIJOL

(Phaseolus vulgaris L.) EN COSTA RICA

Tesis

por

Raúl A. Moreno M.

Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados  
como requisito parcial para optar al grado

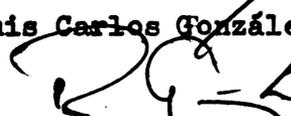
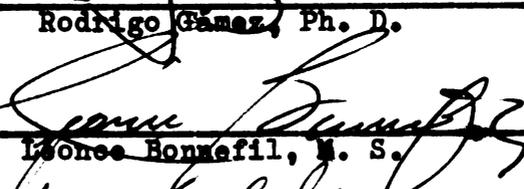
de

Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA

|  |           |
|--|-----------|
|   | Consejero |
| Luis Carlos González, Ph. D.   |           |
|   | Comité    |
| Rodrigo Gámez, Ph. D.  |           |
|  | Comité    |
| Leonor Bonnefil, M. S.   |           |
|  | Comité    |
| George Greene, Ph. D.  |           |

Febrero, 1968

AGRADECIMIENTOS

A mi Consejero Principal Sr. Luis Carlos González por sus enseñanzas y desinteresada ayuda.

Al Sr. Rodrigo Gámez sin cuya dirección este trabajo no habría sido posible.

A los señores Léonce Bonnefil y George Greene por su gentil aporte.

Al Programa de Energía Nuclear del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O. E. A. por el patrocinio de mis estudios en esta Institución.

A todos aquéllos que con su amistad hicieron más grata mi estadía - en Costa Rica

-o-

Este trabajo fue financiado por la Comisión de Energía Atómica de los Estados Unidos de Norteamérica bajo el contrato N<sup>o</sup> AT (30-1)-243.

## BIOGRAFIA

El autor nació en Santiago, Chile, en 1941. Realizó sus primeros estudios en su ciudad natal para ingresar posteriormente en la Facul tad de Agronomía de la Universidad Católica de Chile en donde obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo en 1966. Ese mismo año ingresó al departamento de Fitotecnia y Suelos del Instituto Interamericano de Ciencias A grícolas de la O. E. A. de donde egresó en Febrero de 1968.

## TABLA DE CONTENIDO

|                              | Página |
|------------------------------|--------|
| AGRADECIMIENTOS .....        | iii    |
| BIOGRAFIA .....              | iv     |
| TABLA DE CONTENIDO .....     | v      |
| LISTA DE CUADROS .....       | vi     |
| LISTA DE FIGURAS .....       | viii   |
| INTRODUCCION .....           | 1      |
| REVISION DE LITERATURA ..... | 3      |
| MATERIALES Y METODOS .....   | 11     |
| RESULTADOS .....             | 20     |
| DISCUSION .....              | 41     |
| CONCLUSIONES .....           | 50     |
| SUMMARY .....                | 52     |
| LITERATURA CITADA .....      | 53     |

## LISTA DE CUADROS

| Cuadro N <sup>o</sup> |   | Página |
|-----------------------|---|--------|
| 1                     | Reacción de plantas no leguminosas a la inoculación con extracto infectivo de VF-1 y recuperación del virus .....                   | 22     |
| 2.                    | Reacción de plantas leguminosas a la inoculación con extracto infectivo de VF-1 y recuperación del virus .....                      | 23     |
| 3                     | Reacción de especies del género <u>Phaseolus</u> a la inoculación con extracto de VF-1 y recuperación del virus .....               | 24     |
| 4                     | Reacción de diferentes variedades de frijol a la inoculación con extracto infectivo de VF-1 .....                                   | 25     |
| 5-6                   | Reacción de las plantas de frijol, var. Col 109-R inoculadas con el VF-1 por medio de <u>Myzus persicae</u> .....                   | 30     |
| 7                     | Eficiencia de transmisión y retención individual del VF-1 por <u>Myzus persicae</u> Sulz en plantas de frijol, var. Col 109-R ..... | 31     |
| 8                     | Reacción de plantas de frijol var. Col 109-R inoculadas por medio del áfido <u>Picturaphis brasiliensis</u> Moreira .....           | 32     |
| 9                     | Reacción de plantas de frijol, var. Col 109-R a la inoculación por medio de <u>Diabrotica balteata</u> Leconte .....                | 33     |
| 10                    | Transmisión por la semilla de frijol del VF-1   | 35     |
| 11                    | Inactivación del VF-1 en tejido seco .....  | 35     |
| 12-13                 | Inactivación del VF-1 por calentamiento a diferentes temperaturas .....   | 36     |
| 14-15                 | Pérdida de infectividad por dilución de extracto infeccioso de VF-1 .....   | 37     |
| 16                    | Pérdida de infectividad por envejecimiento <u>in vitro</u> a 20 <sup>o</sup> C de extracto infeccioso de VF-1 .....                 | 38     |

LISTA DE FIGURAS

| Figura N <sup>o</sup> |   | Página |
|-----------------------|---|--------|
| 1                     | Hoja Trifoliada de frijol, var. Col 109-R mostrando los síntomas característicos provocados por VF-1..... | 21     |
| 2                     | Espectro de absorción de una preparación parcialmente purificada del VF-1 .....                           | 40     |

## INTRODUCCION

Las enfermedades virosas de las plantas leguminosas están ampliamente distribuidas en el mundo y son generalmente de gran importancia económica debido a las reducciones que causan en la producción de las plantas afectadas.

En América Central es posible observar considerables ataques de este tipo de enfermedades en el frijol (Phaseolus vulgaris L.) cuya etiología - hasta el momento, ha permanecido en gran parte desconocida, con excepción de algunos estudios realizados recientemente en la Universidad de Costa Rica (27).

Desde hace algún tiempo se viene presentando en la Provincia de Alajuela, Costa Rica, una enfermedad virosa del frijol que se caracteriza por un mosaico de las hojas trifoliadas, que luego se observa en forma de bandas de color verde oscuro que corren paralelas a las nervaduras. Esta enfermedad no está limitada solamente a este país, sino que también se halla en el resto de los países centroamericanos\*.

En el trabajo presente, se intenta una caracterización preliminar del agente infeccioso que causa esta enfermedad. Para ello se determina su rango de hospederos a través de la inoculación del agente causal a distintos tipos de plantas. Se estudia el tipo de transmisión del presente virus por semilla, por insectos y mecánicamente. Además se establecen algunas propiedades del virus en tejido y en extracto de plantas enfermas. Por otra parte se realiza una purificación parcial del agente causal y un análisis espectrofotométrico posterior de la preparación purificada.

---

\* Gámez, R. Comunicación personal.

Este trabajo se realizó entre los meses de julio a diciembre de 1967 en su mayor parte en los laboratorios e invernaderos del Programa de Energía Nuclear del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O. E. A., Turrialba, Costa Rica. Algunos experimentos fueron efectuados en los invernaderos del Departamento de Fitopatología de la Universidad de Costa Rica.

REVISION DE LITERATURA

I. Algunas enfermedades virosas comunes del frijol

A. Mosaico Común.-

La sintomatología inducida por el virus causal de esta enfermedad varía desde un moteado leve apenas perceptible en las hojas trifoliadas, hasta una malformación severa de toda la planta. Las variaciones en sintomatología no sólo se observan entre variedades sino que también pueden ocurrir dentro de una misma variedad, siendo en todo caso influenciadas por las condiciones ambientales. Por lo general, junto con la característica alternación de áreas verde claro y verde oscuro en las hojas, una planta enferma de Mosaico Común puede presentar también enanismo, ramificación excesiva, epinastia y necrosis venal. Las plantas severamente afectadas por esta enfermedad presentan vainas deformadas con manchas de color verde oscuro. Frecuentemente estas vainas contienen menos óvulos y éstos maduran mucho más tarde, lo cual redundará en una menor producción (15, 17, 30, 31, 61).

El virus es llevado de estación en estación a través de la semilla y de planta a planta, dentro de una misma estación, principalmente por medio de insectos. Muchos autores han estudiado la transmisión por semilla del virus del Mosaico Común del frijol y han observado una considerable variabilidad en cuanto a los grados o porcentajes de transmisión por este medio (16, 17, 18, 25, 30, 32, 35, 43, 44). En general las infecciones que ocurren después de la floración no alcanzan a la semilla, mientras que cuanto más temprana sea la infección, tanto mayor será la probabilidad de encontrar el virus en ella (30). Crispín y Grogan (12), estudiando el

efecto del polen y óvulos infectados sobre la transmisión por semilla, informan que el polen es más efectivo que los óvulos como transmisor del virus a la progenie.

El primer antecedente de la transmisión de este virus por insectos fue dado en 1922 por Nelson (29), quien informó que el áfido Macrosiphum solanifolii M. gei. era vector del virus del Mosaico Común del frijol. Posteriormente se citan como vectores también a Macrosiphum pisi, Aphis rumici, Aphis gossypii y Myzus persicae (16, 17, 25, 55, 56, 58).

En 1918 Reddick y Stewart (34) realizaron la primera transmisión mecánica de este virus frotando tejido de plantas enfermas sobre hojas jóvenes de plantas sanas. El método de transmisión mecánica fue perfeccionado por Zaumeyer y Wade (62) quienes usaron un abrasivo sobre las hojas sanas antes de realizar la frotación con el extracto de plantas enfermas.

Las propiedades físicas en jugo de plantas enfermas son algunos de los criterios usados en la caracterización de virus que atacan a las plantas. Entre estas propiedades se pueden citar el punto final de dilución, el punto de inactivación termal y la pérdida de infectividad de un extraeto infectivo por envejecimiento in vitro (26). El virus que provoca el Mosaico Común del frijol, tiene un punto de inactivación termal entre 56-58° C, su punto final de dilución en extracto de plantas infectadas está entre 1:800 y 1:1000 y resiste 28 horas in vitro pero no 32 horas (18, 31, 41).

#### B. Mosaico Amarillo.-

El primer síntoma de esta enfermedad aparece como un moteado severo sobre la superficie de las hojas trifoliadas, que se

destaca mucho más cerca de la inserción con el pecíolo que en el ápice de la hoja. Luego se desarrollan manchas pequeñas y angulares de 1 a 3 mm - de diámetro. Posteriormente las hojas se tornan gruesas, encorvadas y quebradizas, con una apariencia groseramente granular. Eventualmente la planta muestra enanismo por acortamiento de los entrenudos y excesiva ramificación. A medida que la planta es más vieja se puede observar clorosis y marchitamiento; esta severidad de sintomatología sirve, entre otras co sas, para diferenciar esta enfermedad del Mosaico Común (2, 3, 15, 19, 22, 31, 61).

Este virus no sólo causa una enfermedad importante en frijol, sino también en arvejas, trébol rojo, gladiolos y habas (7, 23, 24).

El virus no es transmitido por la semilla, y ellos constituye una de las mayores diferencias entre éste y el virus que incita el Mosaico Común (25, 31).

Aparte de su transmisión mecánica por frotamiento (61) se ci tan diferentes áfidos como vectores de este virus; entre los cuales se cuentan Macrosiphum solanifolii, Macrosiphum pisi, Macrosiphum rosae, Aphis fabae, Aphis gossypii y Myzus persicae (1, 13, 45, 46, 55, 56).

Este virus, en el jugo de plantas infectadas, tiene su punto - de inactivación termal entre 58-60°C; su punto final de dilución está en tre 1:1000 y 1:2000 y resiste un período de envejecimiento in vitro a 18°C de 24 horas, pero no de 32 horas (2, 31, 41).

#### C. Apice Rizado (Curly Top).-

La sintomatología de esta enfermedad, al igual que otras, es - diferente según el grado de susceptibilidad de la variedad ata cada y de la época en que tuvo lugar la infección. Por lo general las ho

jas afectadas se tornan más oscuras y arrugadas, con sus bordes curvados hacia abajo. El arrugamiento se debe a la interrupción del crecimiento de los haces fibrovasculares, siendo evidente el aclaramiento de las venas. Si la infección ocurre cuando la planta sólo ha desarrollado sus hojas primarias, el único síntoma visible es la muerte del ápice de crecimiento y el consecuente amarillamiento y secamiento de toda la planta, sin producción de ninguna hoja trifoliada. En plantas viejas, el primer síntoma notable de la enfermedad es la orientación hacia abajo de las hojas trifoliadas más jóvenes, aún casi antes de que las hojuelas estén totalmente desarrolladas.

El virus es transmitido por la cigarrita de la remolacha (Circulifer tenellus) (9, 10, 14, 28, 61), que puede retener y transmitir el virus durante casi toda su vida.

En extracto de remolacha, el virus posee un punto final de dilución de 1:1000, un punto de inactivación termal de 80° C por 10 minutos y soporta 72 horas de envejecimiento in vitro (37).

#### D. Mosaico Sureño.-

La distribución de esta enfermedad en condiciones de campo no se conoce bien, debido a que sus síntomas, en ciertos casos, pueden confundirse con los producidos por el Mosaico Común y el Mosaico Amarillo (61).

El virus produce reacciones locales o infección sistémica, según la variedad inoculada. La reacción sistémica, tal como en el caso del Mosaico Común, comienza con un moteado leve en las hojas trifoliadas y aumenta en intensidad a medida que la planta alcanza su madurez; el tejido intervenal es más claro que el adyacente a las venas de las hojas y se pre

senta malformación y reducción en el tamaño de éstas. La reacción local se caracteriza por lesiones circulares café-rojizas de 1-3 mm de diámetro y su tamaño está determinado por la variedad infectada, edad de la hoja y número de lesiones por unidad de superficie (4, 15, 20, 21, 57). Los síntomas sobre las vainas son mucho más pronunciados que los producidos por el Mosaico Común, ya que aparecen manchas verde oscuro en variedades de vaina verde y verde-amarillo en variedades de vaina amarilla (61).

Este virus, que está presente en todos los órganos de la planta (11), posee bastante resistencia a ciertos agentes físicos, ya que sólo se inactiva a 90-95° C por 10 minutos; su punto de dilución final es 1:500.000 y tolera 222 días de envejecimiento in vitro a 18° C de temperatura (61). Se caracteriza por ser más infeccioso que ninguno de los otros virus que atacan el frijol. Su transmisión por semilla es relativamente baja (4-61) y en el campo es transmitido por Ceratoma trifurcata Forst (52).

#### E. Otros virus encontrados en frijol.-

• El hecho de que el frijol es susceptible a más de un virus, fue primero descubierto por Carsner (10) en 1926. Más tarde, Wingard (53) demostró que el virus que produce manchas anilladas en el tábaco, produce lesiones locales en frijol. A su vez, Zaumeyer (56) en 1933, mencionó del ataque al frijol por parte de diferentes virus de leguminosas; los síntomas de este ataque no siempre fueron semejantes a los conocidos hasta ese entonces. Luego Thomas y Zaumeyer (47), basados en observaciones de Virgin (48), informan de un virus que ataca al frijol y cuyo síntoma más característico es la coloración rojiza que adquieren los nudos de las plantas, junto con manchas también rojizas y anilladas en

las vainas atacadas. Dicho virus posee un punto de inactivación termal de 56-58° C por 10 minutos; un punto final de dilución de 1:1000 y resiste 24 pero no 32 horas in vitro a 18° C de temperatura; en tejido seco su infectividad se mantiene por 30 días. No se conocen vectores y no existen evidencias de transmisión por semilla. También Zaumeyer y Thomas (59), - Walters (50, 51) y Skotland (39) estudiaron un virus denominado virus del "Moteado de las Vainas" por las manchas y deformaciones que produce en las vainas de las variedades atacadas. Este virus es transmitido por Ceratoma trifurcata Forst. Se inactiva entre 70 y 75° C por 10 minutos; se mantiene infectivo en dilución de 1:1000 pero no a 1:100.000; a 18° C de temperatura resiste 62 días in vitro, pero no 93 días.

En 1950, Zaumeyer y Thomas (60) describen un virus que denominan virus del "Punteado Amarillo" del frijol. Este virus se inactiva por calor entre 72-75° C por 10 minutos y se mantiene activo en dilución de 1:50.000 pero no 1:75.000; resiste 5 días in vitro, a 18° C de temperatura y en tejido seco mantiene su infectividad por 80 días.

Skotland y Burke (40) describen un virus que es transmitido - por semilla en un 2-3% y cuyos síntomas principales son necrosis en las venas de hojas primarias, epinastia, moteado, hojas en forma de cuchara y exceso de brotación. Se inactiva por calentamiento a 60-65° C durante 10 minutos, posee un punto final de dilución entre 1:10.000 y 1:50.000 y permanece infectivo aún después de 72 horas a 17° C de temperatura in vitro. Es un virus transmitido también por áfidos.

Yerkes y Patiño (54) citan la presencia en México de un nuevo virus, semejante al que causa el Mosaico Común, pero cuyos síntomas son mucho más intensos. No se transmite por semilla y sus propiedades físicas

son: punto de inactivación termal, 92° C por 10 minutos, punto final de dilución 1:40.000.000, conserva su infectividad en tejido seco durante 7 meses y en extracto por 11 semanas.

Murillo (27) menciona para Costa Rica la existencia de dos aislamientos virosos semejantes, que según sus caracteres, están estrechamente relacionados con el virus del Mosaico Sureño y la cepa de éste, conocida como Mosaico Severo de México, anteriormente citada como descrita por Yerkes y Patiño. Uno de estos aislamientos, denominado B, fue transmitido experimentalmente por medio de insectos de la especie Diabrotica adelpha Harold.

## II. Identificación de virus que atacan a las plantas.

Algunos virus bien conocidos pueden ser identificados en base a informaciones en relación sólo con algunas de sus propiedades, que son notablemente características, en tanto que para otros es necesario disponer de toda la información posible para poder diferenciarlos de virus similares.

Históricamente la sintomatología ha sido uno de los criterios más usados para la identificación de virus, pero desde hace bastante tiempo se reconocieron sus limitaciones, ya que un mismo virus produce a veces síntomas diferentes en plantas semejantes y diferentes virus provocan iguales síntomas en iguales especies de plantas (36).

Posteriormente se observó que, por lo general, virus diferentes poseen un ámbito de hospederos también diferentes y así entonces, el rango de hospederos de un virus en especial pasó a convertirse en otro criterio a usar en la caracterización de él. A medida que avanzaba la ciencia de la virología vegetal se fueron conociendo los medios de transmisión (mecánica, vector específico, semillas, injerto) y propiedades físicas del jugo

fresco (punto final de dilución, longevidad in vitro y punto de inactivación termal). Estos fueron los únicos criterios usados hasta 1930 aproximadamente.

Luego, la demostración de la inmunidad adquirida y la naturaleza an tigénica de algunos virus vegetales, aportaron dos de las herramientas más empleadas hoy día, tales como pruebas de protección cruzada y las pruebas serológicas respectivamente (5, 33, 36).

Recientemente algunas pruebas in vivo han demostrado tener valor en el diagnóstico de algunos virus. Entre estas pruebas se pueden citar la respuesta diferente frente a la inoculación con un mismo virus que presentan algunas plantas que sólo difieren entre sí en algún carácter genético ya conocido, y también la interacción entre dos virus que son inoculados a la vez en una sola planta y cuya mayor o menor relación es medible en la planta inoculada según el efecto que produzcan sobre ella.

La cristalización del virus del Mosaico del Tabaco (TMV) y la demostración de que es una nucleoproteína, junto con el advenimiento del microscopio electrónico, han aportado gran cantidad de información acerca de algunas propiedades físicas y químicas de los virus. Los aspectos puramente biológicos, aunque de gran importancia en la caracterización e identificación de un virus no pueden, por las razones apuntadas anteriormente, dar base a una identificación definitiva. Estos estudios deben complementarse con estudios físicos y bioquímicos como la determinación de la forma, tamaño y peso molecular de la partícula virosa, aparte de la composición de su ácido nucleico, el número de sus unidades de proteína y la identidad del residuo de aminoácido terminal en la cadena peptídica. Estas propiedades intrínsecas de los virus, más sus relaciones serológicas y sus caracteres de transmisión pueden considerarse como bases más o menos seguras para la clasificación, nomenclatura e identificación de los virus (36).

## MATERIALES Y METODOS

Plantas de frijol que mostraban síntomas de una enfermedad aparentemente virosa, de identidad desconocida, fueron colectadas en la Estación Experimental de la Universidad de Costa Rica en San Josecito de Alajuela. Los síntomas característicos de esta enfermedad consistían en un mosaico de severidad variable, generalmente verde oscuro y verde claro en las hojas trifoliadas que luego se observaba como bandas de color verde oscuro que corrían paralelas a las nervaduras de las hojas; además se presentaba una alteración en la forma de éstas que se tornaban más angostas y alargadas de lo normal y acopadas hacia abajo. Dichas plantas, debidamente etiquetadas, fueron depositadas en bolsas de material plástico y llevadas al laboratorio.

El agente infeccioso que provoca esta enfermedad fue tentativamente denominado Virus del Frijol 1 (VF-1) durante el curso de los experimentos.

### I. Inoculación mecánica

Muestras del material enfermo fueron trituradas en morteros estériles, y la pulpa posteriormente exprimida y filtrada a través de gasa. El extracto así obtenido se frotó, usando el dedo índice, sobre hojas primarias de plantas a inocular, que habían sido previamente espolvoreadas con el abrasivo "carborundum". Luego de la inoculación, las hojas se lavaron a presión leve con agua corriente y las plantas se dejaron en condiciones de invernadero. Especial cuidado se tuvo siempre de lavarse las manos con una solución detergente, antes de inocular o manipular las plantas.

### II. Plantas hospederas

Todas las plantas inoculadas con el VF-1 fueron mantenidas en invernaderos, en los cuales la temperatura promedio en el curso de estos experimentos osciló entre 22-28° C, con una duración del día de 11.8 a 12.7 horas de luz astronómicamente posibles.

Con objeto de conocer el ámbito de hospederos del agente infeccioso en estudio, se procedió a inocularlo mecánicamente sobre plantas no leguminosas y leguminosas. Entre las plantas leguminosas incluídas se inocularon diversas especies del género Phaseolus y a su vez, numerosas variedades de Phaseolus vulgaris L. Todas las semillas de estas plantas fueron pre-germinadas en cámara húmeda a temperatura ambiente (unos 22° C en promedio) y sembradas en macetas de 15 x 20 cms con tierra esterilizada con dibromuro de metilo. Las plantas fueron mantenidas en el invernadero y se seleccionaron para inocular aquéllas que mostraban mayor uniformidad de tamaño y vigor. Si al cabo de un plazo prudencial las plantas inoculadas no mostraban diferencias apreciables con sus testigos, se procedía a efectuar la recuperación del virus en estudio. Para ésto, se tomaba una muestra representativa de las plantas inoculadas, que consistía en hojas o trozos de hojas escogidas al azar en cualquier parte de cada una de las plantas. Con esta muestra compuesta se inocularon plantas de la variedad del frijol Col 109-R que apenas habían expandido totalmente sus hojas primarias. Esta variedad se utilizó rutinariamente por su ya conocida susceptibilidad del virus en estudio. Igual se procedió con plantas que fueron dejadas como testigos, y por otra parte, nuevamente se inoculó en la variedad Col 109-R el extracto proveniente de plantas de frijol se presentaban evidentes síntomas de la enfermedad en estudio. Se tuvo así tres grupos de plantas de frijol Col 109-R: uno inoculado con extracto de plantas que

no mostraban síntomas; otro inoculado con extracto de plantas testigo y el último, inoculado con extracto de plantas de frijol con síntomas de virosis.

A. Plantas no leguminosas.-

Se inocularon entre 6 y 12 plantas jóvenes de Datura stramonium, Chenopodium amaranticolor Coste y Reyn, Chenopodium album L., Nicotiana glutinosa L., Tomate (Lycopersicum esculentum Mill), Pepino (Cucumis sativus L.), Tabaco (Nicotiana tabacum L.) variedad H-425 y Melón (Cucumis melo L.). Para todos los casos se dejaron entre 4 y 6 plantas de testigos que fueron espolvoreadas con carborundum, frotadas con agua estéril y posteriormente lavadas con agua corriente.

B. Plantas leguminosas.-

Se inocularon entre 6 y 10 plantas jóvenes de Haba (Vicia faba L.), Rabiza (Vigna sinensis (L) Endl) de las variedades T-4988, T-4986 y T-5010 de la colección del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (Centro de Turrialba), Arveja (Pisum sativum L.), Alfalfa (Medicago sativa L.) de las variedades Moapa, Tanverde y Caliverde; Garbanzo (Cicer arietinum L.), Trébol rojo (Trifolium pratense L.), Trébol blanco (Trifolium repens L.), Trébol subterráneo (Trifolium subterraneum), Vigna hirta L. y Dolichos lablab L.

Se dejaron 3-4 plantas de cada una como testigos, tratados en idéntica forma al caso anterior.

C. Especies del Género Phaseolus.-

Se inocularon 10 plantas de 6 a 7 días de edad de las siguientes

tes especies: Phaseolus lunatus L., P. ricardeanus, P. mungo, P. acutifolius, P. calcaratus, P. angularis, P. aureus, P. aconitifolius, P. bracteatus y P. lathyroides. Se dejaron 6 plantas de testigos para cada especie. Todas las plantas fueron inoculadas en sus hojas primarias, apenas éstas se habían expandido totalmente.

#### B. Variedades de Phaseolus vulgaris L.-

Para complementar el conocimiento del ámbito de hospederos del virus en estudio, para conocer la reacción de diferentes variedades usadas en Costa Rica frente a este virus y en búsqueda de algunas variedades que reaccionaran localmente a la infección con el objeto de cuantificar el inóculo posteriormente, es que se inoculó el extracto de plantas enfermas en diferentes variedades de frijol. Siempre se inocularon plantas que apenas expandían totalmente sus hojas primarias (6 a 7 días de edad). En todos los casos se inocularon 10 plantas y se dejaron 6 de testigos de las siguientes variedades: 27-R, Mex 24-N, S89-N, Mex 80-R, Bl 157, S182-N, S382-R, C165-Bl, Mex 29-N, Mex 27-N, Col 109-R, Bountiful, Kentucky Wonder, Tendergreen, Great Northern UI #60, Michelite y Pinto 111.

### III. Transmisión por insectos

#### A. Myzus persicae Sulz (Homoptera, Aphididae)\*.-

Para todas las pruebas realizadas con objeto de probar si el VF-1 se transmitía por este áfido, se seleccionaron áfidos vigorosos que fueron colocados en cajas de Petri cubiertas por un papel celofán, en cuyo fondo había un papel filtro humedecido. Los insectos se mantuvie-

---

\* Los áfidos fueron identificados por H. G. Stroyan, Rothamsted Experimental Station y D. balteata por Alvaro Cordero, Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica.

ron en estas condiciones por 2 horas sin alimentación; este período se denominó de ayuno. Luego, con un pincel humedecido se tomó cada vez un á fido y se colocó sobre una hoja de frijol de la variedad Col 109-R, que presentaba evidentes síntomas de la enfermedad en estudio; ahí se le permi tió alimentarse durante varios segundos. Apenas el áfido hubo sacado su estilete del tejido vegetal enfermo, fue removido de la hoja con el mismo pincel y colocado cuidadosamente sobre una planta sana y muy joven de la misma variedad. Sobre esta planta se dispuso un pequeño trozo de papel - en el que se depositó el áfido con objeto de evitar la posible transmisión del virus por medio del pincel. Una vez que el áfido estuvo sobre la nue va planta, se cubrió ésta con un vaso de cristal invertido y así permane ció por un período de minutos o por 24 horas, al cabo de los cuales fue e liminado con Malathión al 0.1%.

B. Picturaphis brasilensis Mbreira (Homoptera, Aphididae)\*.-

En general se realizó con proceso idéntico, pero a este áfido se le permitió permanecer durante 10 minutos en la planta en ferma y luego fue trasladado a la planta joven y sana, en donde permane ció por 24 horas antes de ser eliminado. Se procedió de este modo, debi- do a las dificultades que presenta el manejo de estos áfidos. Se trabajó con 10 áfidos por planta en 14 plantas sanas de la variedad Col 109-R. Se dejaron 4 plantas sanas de testigo y 4 plantas inoculadas mecánicamente.

C. Diabrotica balteata Leconte (Coleoptera, Chrysomelidae)\*.-

Se dispusieron 5 plantas enfermas de la variedad Col 109-R en 2 jaulas de malla fina. Se usaron plantas de buen desarro--

---

\* Los áfidos fueron identificados por H. G. Stroyan, Rothamsted Experi- mental Station y D. balteata por Alvaro Cordero, Facultad de Agrono- mía de la Universidad de Costa Rica.

llo, pero aún bastante tiernas. En cada jaula se colocaron además 40 individuos de D. balteata que permanecieron allí alimentándose por 24 horas. Al cabo de este tiempo y por medio de un succionador bucal, se traspasaron 2 insectos a cada una de las plantas jóvenes de la variedad Col 109-R que iban a ser inoculadas y se mantuvieron allí, bajo un vaso de vidrio invertido por otras 24 horas. Se inocularon así 40 plantas jóvenes de Col 109-R, 8 permanecieron como testigos sanos y 4 fueron inoculadas mecánicamente.

#### IV. Transmisión por semilla

Para conocer si el virus en estudio se transmitía por semilla, se escogieron algunas variedades de frijol que en la colección de variedades de frijol de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Costa Rica habían demostrado estar severamente infectadas\*. Estas variedades fueron: Bola Filadelfia, G. 236-R, G. 257-N, Negro Filadelfia, Nic 230-R, 112-BI, Bayos Filadelfia y Chiricano de Filadelfia. Se sembraron en cajones de tierra estéril 100 semillas de cada una de las variedades y luego, según la expresión de síntomas, se verificó si existía o no transmisión por semilla. Para evitar la eventual presencia de insectos se aplicó Malathión al 0.1% cada 2-3 días durante el experimento. En todos los casos se sembraron 10 semillas provenientes de plantas sanas de la variedad Col 109-R de testigos.

#### V. Resistencia a la inactivación

A. Pérdida de infectividad en el tejido seco por envejecimiento.  
De plantas que mostraban marcados síntomas de la enfermedad se

---

\* Gámez, R. Comunicación personal.

tomaron hojas que fueron divididas en trozos pequeños. Estos trocitos de hojas fueron depositados en pequeños tubos de vidrio que a su vez se colocaron dentro de un disecador con sílica-gel.

Para probar la infectividad del virus en estos trozos pequeños, se maceraron en agua destilada y el extracto fue usado para inocular plantas de Col 109-R. El efecto del envejecimiento en la infectividad se probó a los 1-2-3-4-5-10-15 y 20 días de permanencia en el disecador.

#### B. Inactivación termal.-

Volúmenes de 1-2 ml de extracto de plantas enfermas fueron dispensados cuidadosamente en 4 tubos de vidrio de pared delgada. Estos tubos, sostenidos verticalmente en una gradilla de alambre, fueron colocados en el interior de un baño de agua "Magrii Whirl" modelo MW 1120 a una temperatura constante y determinada. Los tubos se sumergieron de modo que el nivel del agua fuera superior al del extracto dentro del tubo. Los tubos se mantuvieron a la temperatura deseada por 10 minutos y al cabo de ese tiempo fueron sumergidos inmediatamente en agua con hielo. Se realizaron pruebas a temperaturas de 30-40-50-60-70 y 80°C y luego a 55-57-59 y 61°C respectivamente. De cada tubo o tratamiento se inocularon 3 plantas de Col 109-R jóvenes, cuyas hojas primarias recién estaban totalmente expandidas. Se dejaron en total 7 plantas inoculadas con extracto sin calentar, que sirvieron de testigos.

#### C. Tolerancia a la dilución.-

Extracto de plantas infectadas con el VF-1 fue utilizado para preparar diluciones de 1:10, 1:100 hasta 1:1000.000.000 en agua destilada del extracto crudo. Cada una de estas diluciones se inocu-

l6 a 8 plantas. Posteriormente se realizaron diluciones de 1:500, 1:700, 1:900, 1:1000, 1:1300, 1:1500, 1:1700, 1:1900 y 1:2000 y se inoculó cada dilución en 6 plantas, dejando 4 plantas de testigos sin inocular y 4 plantas inoculadas con extracto sin diluir. Todas las plantas fueron de la variedad Col 109-R.

D. Envejecimiento del extracto in vitro.-

Aproximadamente 45 ml de extracto de plantas infectadas fueron depositada en un frasco Erlenmeyer estéril tapado. El frasco fue envuelto en papel aluminio con objeto de protegerlo de la acción de la luz y colocado en una incubadora a 20<sup>o</sup> C de temperatura. A las 8-16-20-24-28-32-36-40-44-48-52-56-60 horas de envejecimiento se sacaron muestras alicuetas que fueron inoculadas en plantas jóvenes de Col 109-R. Se inocularon 8 plantas en cada intervalo de tiempo. Las plantas a inocular habían sido a su vez sembradas a idénticos intervalos de tiempo.

VI. Purificación parcial del virus

Con objeto de verificar que el VF-1 era una núcleoproteína, y como un intento preliminar en la búsqueda de un método adecuado de purificación para una posterior utilización de la muestra purificada en elaboración de antisueros, se probó el método ya descrito por Scott (38).

Plantas infectadas, de 14-21 días de edad, fueron homogenizadas con 2 ml de cloroformo, 2 ml de butanol y 1 ml de fosfato buffer 0.2M, pH 7, - por cada gramo de tejido. Después de filtrado a través de gasa, se mantuvo el extracto en embudo separador aproximadamente 20-22<sup>o</sup> C de temperatura toda una noche. Luego la fase acuosa fue separada y centrifugada a 4,500 rpm durante 20 minutos, con el objeto de clarificarla, e inmediatamente al

macenada a  $-4^{\circ}\text{C}$  de temperatura. Posteriormente esta fase acuosa fue sometida a centrifugaciones diferenciales de alta y baja velocidad alternadamente en la siguiente forma:

|            |                    |
|------------|--------------------|
| 28.000 rpm | durante 2 horas    |
| 10.000 rpm | durante 10 minutos |
| 38.000 rpm | durante 1.5 horas  |
| 10.000 rpm | durante 10 minutos |
| 38.000 rpm | durante 1.5 horas  |
| 10.000 rpm | durante 10 minutos |
| 38.000 rpm | durante 1.5 horas  |

En las centrifugaciones de alta velocidad se resuspendió el sedimento resultante en fosfato buffer 0.01 M, pH 7. En los de baja velocidad, se empleó el supernatante y el sedimento fue descartado. Al cabo de la última centrifugación, el sedimento resuspendido fue dializado contra buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7 a  $5^{\circ}\text{C}$  de temperatura por 12 horas, con un cambio de buffer a las 6 horas.

Para la purificación se usó una centrífuga Beckman "Spince" modelo L y todo el proceso de centrifugación fue llevado a cabo a una temperatura de  $-3^{\circ}\text{C}$ .

Una muestra de la suspensión purificada fue inoculada en plantas de frijol Col 109-R con el objeto de probar su infectividad. Otra parte - fue analizada en un espectrofotómetro DU Beckman, para obtener el espectro de observación del virus entre 200 y 300  $m\mu$ .

## RESULTADOS

### I. Inoculación mecánica

La inoculación de plantas de frijol var. Col 109-R con el extracto del material enfermo traído del campo permitió el aislamiento del virus, ya que se reprodujeron en condiciones de invernadero idénticos síntomas a los observados en el campo, ya descritos. Generalmente la sintomatología típica de esta enfermedad se puede observar en esta variedad de frijol a los 7-8 días a partir de la fecha de inoculación, y se manifiesta principalmente como bandas de color verde oscuro que corren paralelas a las nervaduras de las hojas trifoliadas, tal como se muestra en la Figura 1.

### II. Plantas hospederas

Como puede observarse en los cuadros N<sup>os</sup> 1, 2 y 3, el virus WF-1 tiene su ámbito de hospederos limitado al género Phaseolus. Entre las especies de este género probadas, se observó que P. lunatus y P. acutifolius mostraban en sus hojas trifoliadas los mismos síntomas que son característicos de esta enfermedad en frijol. Sin embargo, probablemente exista una muy estrecha relación entre luminosidad, edad de la planta y manifestación de síntomas para ambas especies, pues los síntomas sólo se hicieron evidentes cuando las plantas poseían ya un tamaño considerable y expusieron sus hojas trifoliadas más altas, a pocos centímetros del techo del invernadero. Los síntomas, especialmente bandas verde oscuro en la zona adyacente a los haces fibrovasculares, sólo fueron observables en las hojas más altas. En P. calcaratus y P. bracteatus se pudo determinar que el virus infecta las plantas pero no produce síntomas en ellas, como lo revela su posterior recuperación en frijol de la variedad Col 109-R, de ya conocida

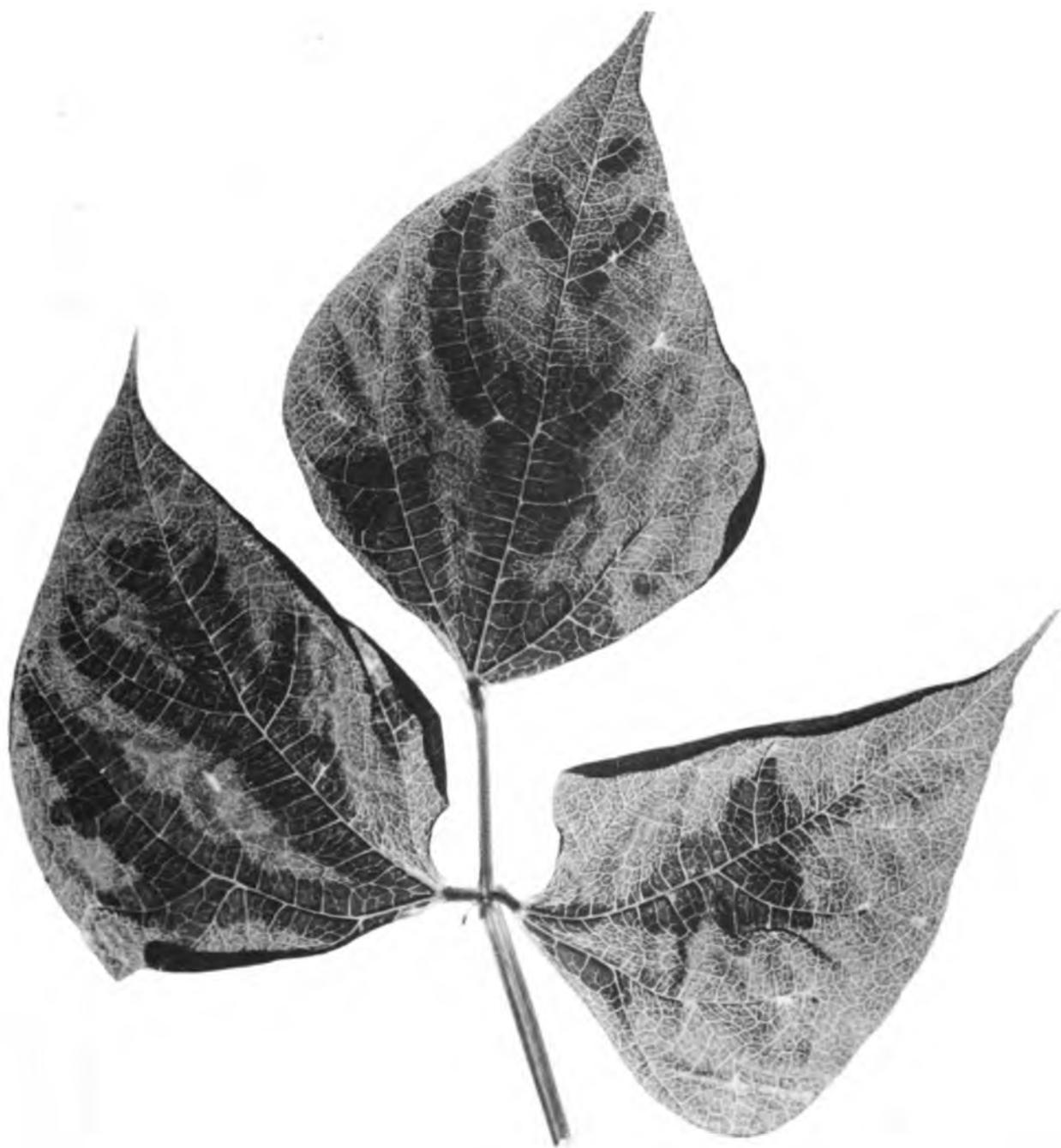


Figura 1. Hojas trifoliadas de frijol var. Col 109-R mostrando síntomas característicos provocados por el VF-1.

Cuadro 1. Reacción de plantas no leguminosas a la inoculación con extracto infectivo de VF-1 y recuperación del virus.

| PLANTAS HOSPEDERAS                             | Recuperación del virus |                                |                              |
|--|------------------------|--------------------------------|------------------------------|
|  | Plantas con síntomas   | Extracto de plantas inoculadas | Extracto de plantas testigos |
| <u>Datura stramonium</u>                       | 0/8*                   | 0/6**                          | 0/3**                        |
| <u>Chenopodium amaranticolor</u>               | 0/6                    | 0/6                            | 0/2                          |
| <u>Chenopodium album</u>                       | 0/6                    | 0/8                            | 0/2                          |
| Tomate ( <u>Lycopersicon esculentum</u> )      | 0/4                    | 0/6                            | 0/4                          |
| Pepino ( <u>Cucumis sativus</u> )              | 0/9                    | 0/6                            | 0/4                          |
| <u>Nicotiana glutinosa</u>                     | 0/10                   | 0/6                            | 0/6                          |
| Tabaco ( <u>Nicotiana tabacum</u> ) var. H-425 | 0/12                   | 0/8                            | 0/6                          |

\* Número de plantas de la hospedera indicada que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

\*\* Número de plantas de frijol var. Col 109-R que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

Cuadro 2. Reacción de plantas leguminosas a la inoculación con extracto infeccioso de VF-1 y recuperación del virus.

| PLANTAS HOSPEDERAS                                   | Recuperación del virus |                                |                              |
|--|------------------------|--------------------------------|------------------------------|
|  | Plantas con síntomas   | Extracto de plantas inoculadas | Extracto de plantas testigos |
| Alfalfa ( <u>Medicago sativa</u> ) var. Moapa        | 0/10*                  | 0/5**                          | 0/2**                        |
| var. Tanverde  | 0/6                    | 0/4                            | 0/3                          |
| var. Caliverde                                       | 0/6                    | 0/5                            | 0/3                          |
| Trébol Blanco ( <u>Trifolium repens</u> )            | 0/12                   | 0/4                            | 0/3                          |
| Trébol Rojo ( <u>Trifolium pratense</u> )            | 0/20                   | 0/4                            | 0/3                          |
| Trébol Subterráneo ( <u>Trifolium subterraneum</u> ) | 0/10                   | 0/4                            | 0/3                          |
| Habas ( <u>Vicia faba</u> )                          | 0/6                    | 0/6                            | 0/3                          |
| Frijol soja ( <u>Glycine max</u> )                   | 0/8                    | 0/6                            | 0/2                          |
| Rabiza ( <u>Vigna sinensis</u> )                     |                        |                                |                              |
| var. T-4988  | 0/6                    | 0/3                            | 0/3                          |
| var. T-4986  | 0/6                    | 0/3                            | 0/2                          |
| var. T-5010  | 0/6                    | 0/3                            | 0/2                          |
| <u>Vigna hirta</u>                                   | 0/6                    | 0/4                            | 0/2                          |
| <u>Dolichos lablab</u>                               | 0/10                   | 0/5                            | 0/3                          |
| <u>Arvejas (Pisum sativum)</u>                       | 0/6                    | 0/4                            | 0/4                          |
| <u>Garvanzo (Cicer arietinum)</u>                    | 0/10                   | 0/5                            | 0/4                          |

\* Número de plantas de la hospedera indicada que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

\*\* Número de plantas de frijol var. Col 109-R que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

Cuadro 3. Reacción de las especies del género Phaseolus a la inoculación con extracto infectivo de VF-1 y recuperación del virus.

| PLANTAS HOSPEDERAS             | Recuperación del virus |                  |   |
|--------------------------------|------------------------|------------------|---|
|                                | Plantas con síntomas   | Tipo de reacción | Extracto de plantas inoculadas plantas testigos |
| <u>Phaseolus lunatus</u>       | 7/10                   | Mo**             | 5/6***  |
| <u>Phaseolus ricardeanus</u>   | 0/10                   | I                | 0/4   |
| <u>Phaseolus mungo</u>         | 0/10                   | I                | 0/4   |
| <u>Phaseolus acutifolius</u>   | 6/10                   | Mo               | 6/6   |
| <u>Phaseolus calcaratus</u>    | 0/10                   | SS               | 4/4   |
| <u>Phaseolus angularis</u>     | 0/10                   | I                | 0/4   |
| <u>Phaseolus aurens</u>        | 0/10                   | I                | 0/3   |
| <u>Phaseolus aconitifolius</u> | 0/10                   | I                | 0/3   |
| <u>Phaseolus bracteatus</u>    | 0/10                   | SS               | 3/3   |
| <u>Phaseolus lathyroides</u>   | 0/10                   | I                | 0/4   |

\* Número de plantas de la hospedera indicada que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

\*\* Mo = moteado o mosaico; I = inmune; SS = sin síntomas, pero el virus fue recuperado.

\*\*\* Número de plantas de frijol de la var. Col 109-R que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

Cuadro 4: Reacción de diferentes variedades de frijol a la inoculación con extracto infeccioso de VF-1\*

| Variedades               | Plantas con síntomas | Tipo de reacción                    |
|--------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| 27 R                     | 0/10*                | I                                   |
| Mex 24-N                 | 0/10                 | I                                   |
| S 89-N                   | 0/10                 | I                                   |
| Mex 80-E                 | 3/7                  | Mb                                  |
| HL 157                   | 6/8                  | Mb; Ma; EB; CL; E; N; EH; BV; NA; M |
| S 182-N                  | 0/10                 | I                                   |
| S 382-E                  | 10/10                | Nb; E; EH; BV; M                    |
| C 165-HL                 | 7/7                  | Mo; Ma; EB; CL; E; N; EH; BV; NA; M |
| Mex 29-N                 | 10/10                | Mo; Ma; EB; CL; E; EH; BV; M        |
| Mex 27-N                 | 0/10                 | I                                   |
| Col 109-E                | 9/10                 | Mo; Ma; EB; CL; E; EH; BV           |
| Bountiful                | 10/10                | Mo; CL; E                           |
| Kentucky Wonder          | 0/10                 | I                                   |
| Tendergreen              | 0/10                 | I                                   |
| Great Northern UI #60    | 6/10                 | LL; MA                              |
| Michelite                | 0/10                 | I                                   |
| Pinto 111                | 3/10                 | LL; MA                              |
| Stringless Green Refugee | 5/10                 | SS                                  |

\* Número de plantas de la hospedera indicada que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

-Significado de los símbolos-

- |                          |  |   |
|--------------------------|--|---|
| Mo = moteado o mosaico   | E = enanismo                             | NA = necrosis apical                            |
| Ma = malformación        | N = necrosis                             | LL = lesiones locales                           |
| EB = exceso de brotación | EH = enrollamiento de la hoja            | M' = marchites                                  |
| CL = clorosis            | BV = banda más oscura cerca de las venas | MA = manchas en anillo                          |
|                          |  | SS = sin síntomas, pero el virus fue recuperado |
|                          |  | I = inmune                                      |

susceptibilidad a la enfermedad.

Al comparar los resultados obtenidos con los descritos por otros investigadores que han estudiado el ámbito de hospederos del virus del Mosaico Común del frijol, se difiere únicamente de los resultados que obtuvieron Zaumeyer y Wade (62) en que estos autores mencionan a P. vulgaris como el único hospedero de este virus. Sin embargo, Reddick y Stewart (34) y Pierce (31) citan a P. lunatus y a P. acutifolius como hospederos de este virus, tal como ocurrió en el presente estudio. Por otra parte Nelson (30) cita a P. lunatus, P. acutifolius, P. calcaratus, P. angularis, P. acutifolius y P. mungo como susceptibles a este virus. En relación con otro tipo de plantas hospederas, aparte de las ya nombradas, también Reddick y Stewart (34) citan a Vicia faba como hospedera del virus del Mosaico Común del frijol y a su vez Pierce (31) menciona como susceptible a este virus a especies del género Vigna. Ninguno de estos dos tipos de plantas anteriormente citados, resultaron susceptibles en el trabajo presente.

En relación con las variedades de frijol ensayadas en este trabajo, la mayoría de éstas ya habían sido observadas en su reacción frente a dos aislamientos del virus del Mosaico Sureño descritos para Costa Rica por Murrillo (27) y a un aislamiento del virus del Mosaico Rugoso\*. La sintomatología presentada por las variedades inoculadas con el virus del presente estudio difiere radicalmente de la presentada por las mismas variedades inoculadas con los virus mencionados anteriormente.

Cabe resaltar la reacción presentada por las variedades Bl 157 y C 165 Bl; los síntomas se presentan muy corto tiempo (4-5 días) después de la inoculación y son muy severos. La planta se deforma totalmente y se produce marchitez prematura que comienza por el extremo superior. Las ho

---

\* Gámez, R. Comunicación personal.

jas cotiledonales sufren necrosis venal seguida de amarillamiento y caída.

La sintomatología en la variedad Col 109-R es muy característica, - ya que reacciona con un mosaico típico de las hojas trifoliadas, que pronto se observan cruzadas por bandas de color verde oscuro que corren paralelas a las venas. Las plantas inoculadas muy jóvenes o por medio de insectos vectores, presentan sus hojas trifoliadas en forma de cuchara, inclinadas hacia abajo y muy angostas. La sintomatología de esta variedad se afecta en gran medida por factores como concentración de inóculo, edad de la planta, temperatura y luminosidad principalmente.

Ninguna de las variedades probadas presentó reacciones locales adecuadas como para poder estudiar cuantitativamente cualquier propiedad del virus. Great Northern UI #60, Pinto 111 y Stringless Green Refugee mostraron, al cabo de varios días de la inoculación, síntomas locales en forma de anillos grandes color café rojizo sobre las hojas primarias. Estas lesiones anilladas eran poco numerosas y difícilmente contables.

Otra reacción destacable fue ofrecida por la variedad Bountiful, - que sólo reaccionó con un mosaico relativamente leve, un grado de clorosis no muy marcado y sólo un enanismo incipiente al comparársele con sus testigos sanos.

De la recuperación del virus en las plantas que no presentaban síntomas se concluye en que sólo la variedad Stringless Green Refugee es hospedera sin síntomas. En la literatura (15) se cita a Michelite, Pinto 111 y Great Northern UI #60 como resistentes a la raza típica del virus del Mosaico Común. Estas variedades no fueron atacadas por el VF-1 en el presente estudio. También Michelite y Pinto 111 se citan como susceptibles al virus del Mosaico Amarillo del frijol.

### III. Transmisión por insectos

Los resultados de los experimentos de transmisión del virus por medio de áfidos demuestran que M. persicae es un vector eficiente del virus. En una prueba preliminar en la que se emplearon 15 ejemplares de M. persicae por planta, todas las plantas resultaron infectadas, como lo demuestra el Cuadro 5. Después se procedió a un ensayo mayor, en el que se usaron sólo 5 áfidos por planta y en el cual 17 de 20 plantas probadas fueron infectadas (Cuadro 6). Posteriormente, efectuando la transmisión a través de un sólo individuo, se determinó la eficiencia de transmisión del vector. En este experimento se usó sólo un áfido por planta; cada áfido permaneció 10 minutos en una primera planta, y 24 horas en una segunda planta a la que el áfido fue transferido al concluir el primer período. Con esto se quiso estudiar la eficiencia de transmisión y la retención del virus por el áfido determinada por el hecho de que el vector perdiera o no el virus después de alimentarse unos pocos minutos sobre una planta sana. Según los resultados obtenidos, la eficiencia de transmisión fue del 52.3% o sea, se infectaron 11 de 21 plantas inoculadas por permanencia de 10 minutos del áfido sobre ellas (Cuadro 7). Del segundo grupo de plantas, en las que los áfidos permanecieron 24 horas, ninguna mostró síntomas, lo que demuestra que el virus pertenece al grupo de los "no persistentes" o portados en el estilete (42) y que el virus es adquirido y retenido solamente por un período de pocos minutos.

En el cuadro N<sup>o</sup> 9, se demuestra que en el trabajo presente el áfido Picturaphis brasilensis no fue vector del VF-1.

También los resultados del Cuadro N<sup>o</sup> 10 demuestran que el crisoméli do D. balteata no es vector del virus, pues a pesar de la gran cantidad de

individuos empleados, no se consiguió transmisión por ninguno de ellos.

Entre los primeros investigadores que trabajaron con áfidos para lograr la transmisión del virus del Mosaico Común del frijol, se puede citar a Fajardo (18) quien en 1930 logró transmitir este virus por medio de M. persicae. Posteriormente Zaumeyer (55) y Zaumeyer y Kearns (58) también consiguieron la transmisión no sólo por M. persicae sino también por otros áfidos; sin embargo no lograron la transmisión de este virus por otros insectos que no fuesen áfidos. En este aspecto, los resultados obtenidos con el presente trabajo concuerdan con los autores citados anteriormente ya que se logró transmisión por M. persicae y no por D. balteata.<sup>4</sup>

#### IV. Transmisión por la semilla

En los ensayos realizados con objeto de comprobar la existencia de transmisión del VF-1 por medio de la semilla se determinó claramente que existe transmisión por este medio. Así lo indica el cuadro N<sup>o</sup> 10, en el que se puede observar que en las variedades probadas ocurre desde un 21 hasta un 58% de transmisión. Comparando estos resultados con la literatura se tiene que en general están de acuerdo con otros investigadores ya que Burkholder y Muller (8) citan que a menudo existe más de un 50% de transmisión por la semilla del virus del Mosaico Común del frijol. En cambio Pierce y Hungerford (32) informan que el grado de transmisión de este virus por la semilla se encuentra próximo a un 33%. De cualquier modo, en la literatura se encuentra una considerable variabilidad en los porcentajes citados de transmisión del virus del Mosaico Común del frijol por medio de la semilla (16, 17, 18, 25, 30, 32, 35, 43, 44).

#### V. Resistencia a la inactivación

Cuadro 5. Reacción de las plantas de frijol, var. Col 109-R inoculadas con el VF-1 por medio de Myzus persicae Sulz.

| Colonia* | Reacción de la planta** |
|----------|-------------------------|
| 1        | +                       |
| 2        | +                       |
| 3        | +                       |
| 4        | +                       |

\* Cada colonia consta de 15 áfidos.

\*\* (+) = Presencia de síntomas; (-) = Ausencia de síntomas.

Cuadro 6. Reacción de plantas de frijol, var. Col 109-R inoculadas con el VF-1 por medio de Myzus persicae Sulz.

| Colonia* | Reacción de la planta | Colonia* | Reacción de la planta** |
|----------|-----------------------|----------|-------------------------|
| 1        | +                     | 11       | +                       |
| 2        | +                     | 12       | +                       |
| 3        | +                     | 13       | +                       |
| 4        | +                     | 14       | +                       |
| 5        | +                     | 15       | +                       |
| 6        | +                     | 16       | -                       |
| 7        | +                     | 17       | +                       |
| 8        | -                     | 18       | +                       |
| 9        | +                     | 19       | +                       |
| 10       | +                     | 20       | -                       |

\* Cada colonia consta de 5 áfidos.

\*\* (+) = Presencia de síntomas; (-) = Ausencia de síntomas

Cuadro 7. Eficiencia de transmisión y retención individual del VF-1 por Myzus persicae Sulz; en plantas de frijol var. Col 109-R.

| Individuo N <sup>o</sup> | Reacción de la planta a 10 minutos de alimentación* | Reacción de la planta a las 24 horas* |
|--------------------------|---|---------------------------------------|
| 1                        | -   | -                                     |
| 2                        | -   | -                                     |
| 3                        | -   | -                                     |
| 4                        | +   | -                                     |
| 5                        | -   | -                                     |
| 6                        | +   | -                                     |
| 7                        | +   | -                                     |
| 8                        | +   | -                                     |
| 9                        | -   | -                                     |
| 10                       | -   | -                                     |
| 11                       | -   | -                                     |
| 12                       | +   | -                                     |
| 13                       | -   | -                                     |
| 14                       | +   | -                                     |
| 15                       | +   | -                                     |
| 16                       | +   | -                                     |
| 17                       | +   | -                                     |
| 18                       | -   | -                                     |
| 19                       | -   | -                                     |
| 20                       | +   | -                                     |
| 21                       | +   | -                                     |

\* (+) - Presencia de síntomas; (-) = Ausencia de síntomas

Cuadro 8. Reacción de plantas de frijol var. Col 109-R inoculadas por medio del áfido Picturaphis brasilensis Moreira.

---

| Colonia* | Reacción de la planta** |
|----------|-------------------------|
| 1        | -                       |
| 2        | -                       |
| 3        | -                       |
| 4        | -                       |
| 5        | -                       |
| 6        | -                       |
| 7        | -                       |
| 8        | -                       |
| 9        | -                       |
| 10       | -                       |
| 11       | -                       |
| 12       | -                       |
| 13       | -                       |
| 14       | -                       |

---

\* Cada colonia consta de 10 áfidos

\*\* (+) = Presencia de síntomas;  
(-) = Ausencia de síntomas

Cuadro 9. Reacción de plantas de frijol var. Col 109-R a la inoculación por medio de Diabrotica balteata Leconte.

| Colonia* | Reacción de la planta** | Colonia* | Reacción de la planta** |
|----------|-------------------------|----------|-------------------------|
| 1        | -                       | 21       | -                       |
| 2        | -                       | 22       | -                       |
| 3        | -                       | 23       | -                       |
| 4        | -                       | 24       | -                       |
| 5        | -                       | 25       | -                       |
| 6        | -                       | 26       | -                       |
| 7        | -                       | 27       | -                       |
| 8        | -                       | 28       | -                       |
| 9        | -                       | 29       | -                       |
| 10       | -                       | 30       | -                       |
| 11       | -                       | 31       | -                       |
| 12       | -                       | 32       | -                       |
| 13       | -                       | 33       | -                       |
| 14       | -                       | 34       | -                       |
| 15       | -                       | 35       | -                       |
| 16       | -                       | 36       | -                       |
| 17       | -                       | 37       | -                       |
| 18       | -                       | 38       | -                       |
| 19       | -                       | 39       | -                       |
| 20       | -                       | 40       | -                       |

\* Cada colonia consta de 2 individuos

\*\* (+) = Presencia de síntomas;  
(-) = Ausencia de síntomas

Las propiedades del virus en extracto y en tejido que fueron estudiadas aparecen en los cuadros 11 al 16.

El tiempo que el virus permanece infectivo en el tejido seco es hasta 4 días, pero no mayor de 5 días (Cuadro 11). Esta es una medida de un valor relativo que depende en parte de la relación patógeno-hospedero y también del proceso de secamiento en sí. El resultado obtenido está en general de acuerdo con el citado por Fajardo (18) quien menciona que 72 horas de envejecimiento es el máximo de tiempo en que permanece infectivo el virus del Mosaico Común del frijol en tejido disecado.

En la inactivación del virus por calentamiento (Cuadro 12), se observa de que a los 50° C hay todavía infectividad, pero no a los 60° C de temperatura. Luego, al efectuar calentamientos a intervalos de 2° C (Cuadro 13), se nota que la infectividad se mantiene a los 57° C, pero se reduce considerablemente a los 59° C. El punto de inactivación termal del virus se halla entonces entre los 59 y 60° C de temperatura.

De los Cuadros 15 y 16 se observa que el punto final de dilución del virus se encuentra entre 1:1000 y 1:2000. Más precisamente la infectividad baja a partir de las diluciones de 1:300 y 1:500 o mayores.

En la inactivación del extracto infectivo por envejecimiento in vitro (Cuadro 16), se observa que a partir de las 40-44 horas de envejecimiento comienza un notable descenso en la cantidad de plantas que se infectaron y puede decirse que el virus en estudio resiste, a 20° C de temperatura, 48 horas pero no 56 horas de envejecimiento.

Los resultados obtenidos para el punto de inactivación termal, para el punto final y para el tiempo de inactivación del extracto infectivo por envejecimiento in vitro a 20° C, están en general de acuerdo con todos los

Cuadro 10. Transmisión por la semilla de frijol del VF-1.

| Variedad             | Nº de semillas probadas | Plantas con síntomas | Porcentaje de transmisión |
|----------------------|-------------------------|----------------------|---------------------------|
| Bola Filadelfia      | 100                     | 58                   | 58%                       |
| Chiricano Filadelfia | 100                     | 57                   | 57%                       |
| Negro Filadelfia     | 100                     | 21                   | 21%                       |
| Nic 230-R            | 100                     | 52                   | 52%                       |
| 112-Bl               | 100                     | 34                   | 34%                       |
| G 236-R              | 100                     | 48                   | 48%                       |
| G 257-N              | 100                     | 27                   | 27%                       |

Cuadro 11. Inactivación del VF-1 en tejido seco

| Tiempo de envejecimiento | Plantas con síntomas |
|--------------------------|----------------------|
| 15 horas                 | 6/6*                 |
| 1 día                    | 6/6                  |
| 2 días                   | 6/6                  |
| 3 días                   | 5/6                  |
| 4 días                   | 1/6                  |
| 5 días                   | 0/10                 |
| 10 días                  | 0/7                  |
| 15 días                  | 0/14                 |
| 20 días                  | 0/7                  |

\* Número de plantas de frijol var. Col 109-R que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

**Cuadro 12.** Inactivación del VF-1 por calentamiento a diferentes temperaturas.

| Temperatura<br>° C | Plantas con<br>síntomas |
|--------------------|-------------------------|
| 30                 | 12/12*                  |
| 40                 | 12/12                   |
| 50                 | 8/12                    |
| 60                 | 0/12                    |
| 70                 | 0/12                    |
| 80                 | 0/12                    |
| sin calentar       | 4/ 4                    |

\* Número de plantas de frijol var. Col 109-R con síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

**Cuadro 13.** Inactivación del VF-1 por calentamiento a diferentes temperaturas.

| Temperatura<br>° C | Plantas con<br>síntomas |
|--------------------|-------------------------|
| 55                 | 5/10*                   |
| 57                 | 6/13                    |
| 59                 | 1/ 9                    |
| 61                 | 0/12                    |
| sin calentar       | 3/ 3                    |

\* Número de plantas de frijol var. Col 109-R que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

Cuadro 14. Pérdida de infectividad por dilución de extracto infeccioso de VF-1.

| Dilución      | Plantas con síntomas |
|---------------|----------------------|
| 1:10          | 8/8*                 |
| 1:100         | 6/8                  |
| 1:1000        | 8/8                  |
| 1:10.000      | 0/8                  |
| 1:100.000     | 0/8                  |
| 1:1.000.000   | 0/8                  |
| 1:10.000.000  | 0/8                  |
| 1:100.000.000 | 0/8                  |
| sin diluir    | 4/4                  |

- \* Número de plantas de frijol var. Col 109-R que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

Cuadro 15. Pérdida de infectividad por dilución de extracto infeccioso de VF-1.

| Dilución   | Plantas con síntomas |
|------------|----------------------|
| 1:500      | 4/6*                 |
| 1:700      | 5/6                  |
| 1:900      | 6/6                  |
| 1:1.100    | 6/6                  |
| 1:1.300    | 4/6                  |
| 1:1.500    | 1/6                  |
| 1:1.700    | 0/6                  |
| 1:1.900    | 1/6                  |
| 1:2.000    | 0/6                  |
| sin diluir | 4/4                  |

- \* Número de plantas de frijol var. Col 109-R que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

Cuadro 16. Pérdida de infectividad por envejecimiento in vitro a 20° C de extracto infeccioso de VF-1.

| Tiempo de envejecimiento | Plantas con síntomas |
|--------------------------|----------------------|
| 8 horas                  | 8/8*                 |
| 16                       | 8/8                  |
| 20                       | 6/8                  |
| 24                       | 7/7                  |
| 28                       | 7/7                  |
| 32                       | 7/8                  |
| 36                       | 7/8                  |
| 40                       | 2/8                  |
| 44                       | 4/7                  |
| 48                       | 2/8                  |
| 52                       | 3/8                  |
| 56                       | 0/8                  |
| 60                       | 0/8                  |

\* Número de plantas de frijol var. Col 109-R que mostraron síntomas, sobre número de plantas inoculadas.

autores que han estudiado previamente estas propiedades para el virus del Mosaico Común del frijol (18, 31, 41).

#### VI. Purificación parcial del virus

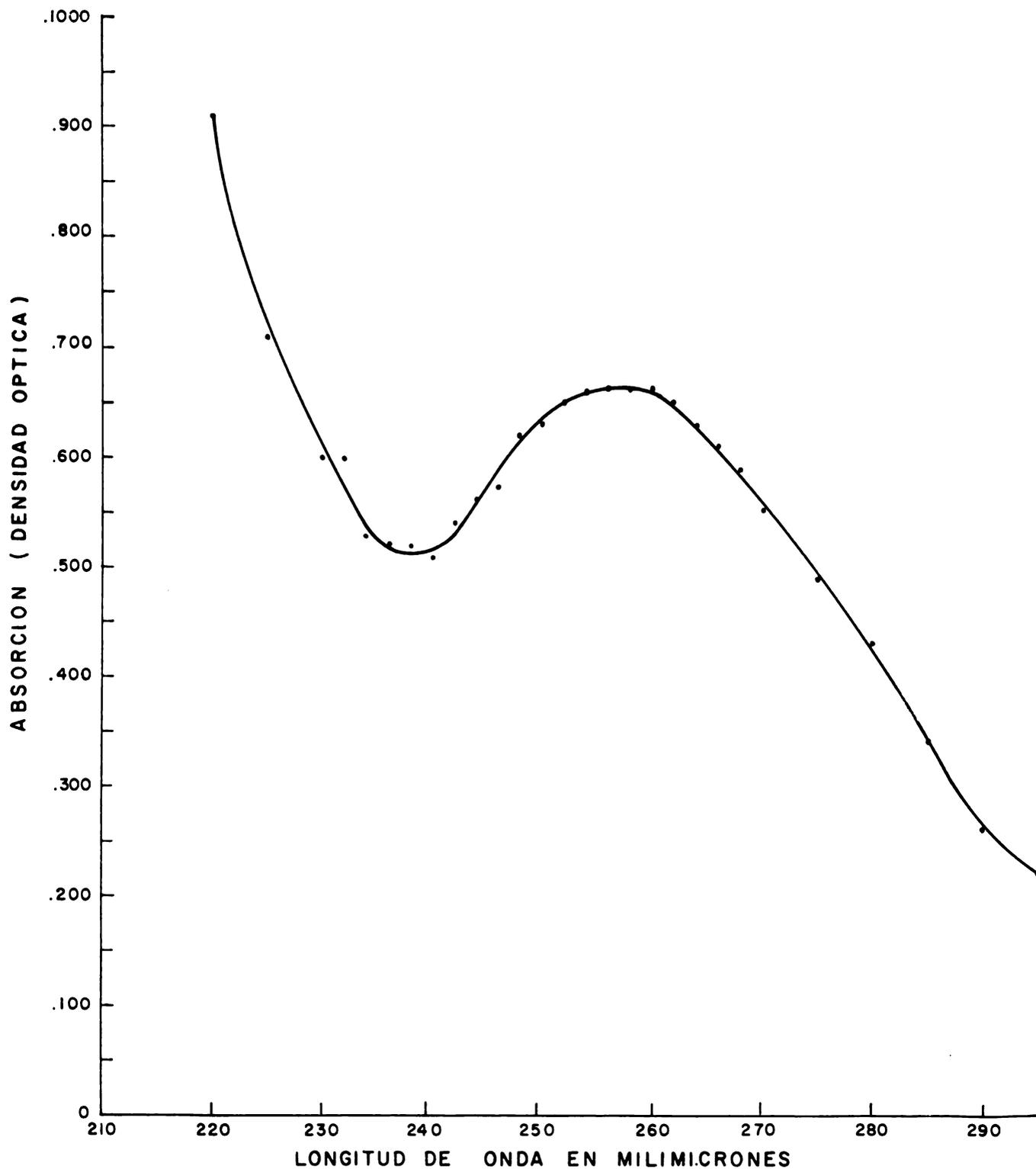
El extracto clarificado por el procedimiento de cloroformo y butanol fue sometido a centrifugaciones diferenciales en la forma ya descrita por el método de Scott (38). Durante el curso de las centrifugaciones fue posible observar que la opalescencia característica de las proteínas desaparecía a medida que el proceso avanzaba y aparentemente ésto indicaba que había una gran pérdida de virus en la preparación. En las preparaciones purificadas del virus que provenían de muestras de 300 a 400 gramos de tejido enfermo, se estimó que éstas no contenían más de medio miligramo de virus por centímetro cúbico\*. Sin embargo estas preparaciones, al ser inoculadas en plantas jóvenes de frijol variedad Col 109-R, reprodujeron los síntomas característicos de la enfermedad, tal como ocurría al inocular esta variedad con extracto infectivo no clarificado.

Otra parte de la suspensión fue analizada en el espectrofotómetro para comprobar si el agente infeccioso en estudio era una núcleoproteína. El resultado obtenido se puede apreciar en la Figura 2, que revela una curva típica de una núcleoproteína, con un mínimo y un máximo de absorción aproximados entre 240-260 milimicrones de longitud de onda. Aparentemente la preparación no era lo suficientemente pura, ya que la curva aparece quebrada.

---

\* Gámez, R. Comunicación personal.

FIGURA 2.- ESPECTRO DE ABSORCION DE UNA PREPARACION PARCIALMENTE PURIFICADA DEL VF-1.-



## DISCUSION

Los resultados de esta investigación, sobre la identidad del virus aislado en la Estación Experimental de la Universidad de Costa Rica, indican claramente que puede tratarse del virus del Mosaico Común del frijol o de una varianza o raza de él.

Respecto al ámbito de hospederos del VF-1, en el presente estudio no se observó ninguna reacción frente al virus por otra especie de plantas aparte de las pertenecientes al género Phaseolus.

Dentro de las plantas del género Phaseolus inoculadas, los resultados obtenidos concuerdan en parte con los de Reddick y Stewart (34), quienes citan también a P. lunatus y a P. acutifolius como hospederos del virus del Mosaico Común del frijol, pero difieren en relación con Vicia faba que en presente estudio no fue atacada pero que es descrita como susceptible por estos autores. Nelson (30) cita, además de los hospederos anteriores, a P. calcaratus, que también se mostró susceptible en este estudio; sin embargo, este autor menciona a P. angularis, P. aconifolius y P. mungo como hospederos del virus del Mosaico Común, lo que no ocurrió en este ensayo. En parte, también los resultados están de acuerdo con Pierce (31) quien cita como hospederos del virus del Mosaico Común a P. lunatus y P. acutifolius, tal como ocurrió en el estudio presente, pero Pierce cita también como hospederos de este virus a especies del género Vigna, que no fueron atacadas por VF-1. Por último, los resultados de este ensayo de plantas hospederas difieren de los obtenidos por Zaumeyer y Wade (62) quien informa sólo a P. vulgaris como único hospedero del virus del Mosaico Común del frijol. Los resultados aparentemente contradictorios que se describen, serán mejor analizados al considerar las condiciones diferentes del -

lugar de trabajo, la época en que se efectuaron y la falta de patrones comunes a seguir en la metodología de un ensayo de susceptibilidad de plantas a determinado virus. Sin embargo, hay coincidencia por parte de todos los autores en la restricción del virus dentro del género Phaseolus.

A pesar de que ámbito de hospederos del virus del Mosaico Común del frijol, es en general semejante al del Mosaico Amarillo (61)', Zaunmeyer y Wade (62) citan como hospederos de este último a Phaseolus aureus, Vicia arietinum, Pisum sativum y Trifolium pratense, que en este trabajo no se presentaron como susceptibles. Por otra parte, Afanasiev y Morris (2) citan como hospedero del virus del Mosaico Amarillo del frijol al Frijol de Soya (Glycine max) que en este experimento no se demostró atacado.

Entre las variedades de frijol probadas, Michelite, Pinto 111 y Great Northern UI #60, que se citan como resistentes a la raza típica del virus del Mosaico Común del frijol (15-49), pero susceptibles a la raza llamada de Burkholder, New York 15 o Strain A, en este ensayo también se mostraron resistentes. A su vez, Michelite y Pinto 111 se citan como susceptibles al virus del Mosaico Amarillo del frijol y, como en este estudio no presentaron los síntomas que caracterizan esta enfermedad, se obtienen algunos antecedentes como para considerar que el VF-1 no es el virus que incita el Mosaico Amarillo. En suma, el rango de hospederos estudiado aporta algunas evidencias para suponer que pueda tratarse del virus que causa el Mosaico Común del frijol.

En relación con la transmisión del VF-1, se demostró que es transmitido en el estilete por el áfido Myzus persicae, ya que el virus fue adquirido por el áfido en un corto período de tiempo probando sobre una planta enferma. La retención del virus por parte del áfido es muy corta, puesto

que con sólo 10 minutos de permanencia en una planta sana, se perdió la capacidad del áfido para transmitir el virus. Diversos autores citan a este áfido como vector del virus del Mosaico Común del frijol (16-17-25-55-56-58). Picturaphis brasiliensis, que en este trabajo no fue vector del VF-1, se encuentra esporádicamente colonizando frijoles en Costa Rica\*. No se encontró transmisión a través de insectos masticadores como Diabrotica balteata, que sí transmite el virus del Mosaico Rugoso del frijol\*. En la literatura no se menciona a ningún insecto masticador como vector del virus del Mosaico Común del frijol (16-17-25-55-56-58).

La transmisión por la semilla constituye una de las diferencias entre el virus del Mosaico Común del frijol y del Mosaico Amarillo, ya que este último no es transmisible por la semilla (61). En esta experiencia se observó desde un 21 a un 58% de transmisión por este medio lo que aporta evidencia a la hipótesis que el VF-1 sea el virus que incita el Mosaico Común del frijol. Los grados o porcentajes de transmisión a través de la semilla están de acuerdo con los antecedentes aportados en la literatura por Reddick y Stewart (35)\*, quienes demostraron que existe una considerable variabilidad en los porcentajes de transmisión del Mosaico Común por este medio. Burkholder y Muller (8) informan de plantas afectadas de Mosaico Común y cuyo porcentaje de transmisión por intermedio de la semilla fue superior a un 50%. Pierce y Hungerford (32) en sus experiencias demostraron que existe un 33% de transmisión de este virus por medio de semillas. Fajardo (17-18) probó lo que más tarde sería corroborado por Harrison (25)\*, de que el porcentaje de infección de la semilla está relacionado con determinados períodos del crecimiento de la planta. O sea, si la infección o

---

\* Gámez, R. Comunicación personal.

ocurre antes de la floración, la semilla puede ser portadora del virus, pero si la infección ocurre después de la floración, no se presenta transmisión por intermedio de la semilla. Sin embargo, Nelson (30) ha observado que cuando la variedad de frijol es muy susceptible al Mosaico Común, la transmisión por semilla ocurre así cualquiera sea el estado de desarrollo de la planta en el instante de ser inoculada con el virus.

Las evidencias de transmisión por la semilla obtenidas con este estudio revelan que las variedades ensayadas pudieron haber recibido el inóculo en su primer estado de desarrollo, o sea antes de la floración, para poder transmitir el virus a través de la semilla. Por otra parte, según Smith y Hewitt (43), las variedades más susceptibles, transmiten el virus en mayor grado a través de la semilla y entonces los porcentajes diferentes obtenidos en este estudio, no sean sino el reflejo de la mayor o menor susceptibilidad de la variedad. También es necesario considerar de que según Harrison (25) las plantas que crecen de semillas infectadas transmiten el virus a sus semillas en un mayor grado que las no provenientes de semillas infectadas; luego, el uso continuo de una variedad que transmite el virus del Mosaico Común por la semilla aumenta a la larga el grado de transmisión por este medio; con respecto a este último punto, se puede pensar que en el futuro los porcentajes de transmisión demostrados por las variedades aquí ensayadas pueden aumentar aún más.

En relación con las diferentes propiedades del VF-1, tanto en tejido como en extracto, se puede citar la resistencia del virus a la inactivación en tejido disecado que para esta experiencia demostró ser de 3-4 días. Estos resultados concuerdan con los de Fajardo (18), de 72 horas aproximadamente. Esta es una medida de un valor relativo que en la literatura se

encuentra pocas veces. Sólo reviste alguna importancia cuando se hace necesario almacenar el inóculo en alguna forma con objeto de proseguir más tarde algún trabajo especial. Es una medida muy condicionada a la relación patógeno-hospedero y a las condiciones de disecado mismas. Numerosos investigadores (17-18-30-31-41) citan que tanto para el virus del Mosaico Común como para el Mosaico Amarillo del frijol, las propiedades en extracto son:

- Punto final de dilución entre 1:1000 y 1:2000 en agua destilada.
- Punto de inactivación termal entre 55 y 60° C por 10 minutos.
- Envejecimiento del extracto in vitro a 18-20° C entre 32 y 48 horas.

Con respecto a las propiedades anteriormente nombradas, cabe destacar que a pesar de los esfuerzos de Bos et al (6) para fijar ciertas normas patrones a seguir en la identificación de virus de leguminosas, los datos que menciona la literatura son el producto de diferentes investigadores trabajando bajo condiciones también diferentes y siguiendo procesos similares pero no idénticos. Esta carencia de uniformidad ha traído como consecuencia una variabilidad de resultados, ya que el jugo crudo de plantas infectadas de diferentes especies es casi siempre diferente en concentración de virus, en composición química y en pH. Sin embargo, las propiedades en extracto han probado ser de un valor considerable en la caracterización • identificación de virus (6). El punto final de dilución del VF-1 se encuentra, según los resultados obtenidos, entre 1:1000 y 1:2000, lo que concuerda totalmente con los autores ya citados. Esta es una medida que se afecta en gran parte por la temperatura en la cual se encontraban las plantas que fueron fuente del extracto, porque la temperatura afecta en gran medida la concentración del virus en el tejido, y al igual que otras medidas, ésta se a

fecta también por las condiciones químicas de la savia en la que se encuentra el virus (36).

En cuanto al punto de inactivación termal del VF-1, éste se encuentra entre los 59 y 60° C de temperatura, lo que también está de acuerdo a la literatura citada anteriormente. La inactivación del virus en esta medida, no sólo depende de la temperatura aplicada sino también del pH y de las condiciones químicas del jugo en el que se encuentra el virus, aunque sobre esta medida tiene menor importancia la condición química del extracto infectivo (18-31-36-41).

El tiempo que el virus permanece infectivo a 20° C de temperatura - en extracto in vitro que fue de 48 horas pero no de 56 horas, también coincide con el citado por otros investigadores. Acerca de esta medida se tiene que es afectada por numerosos factores como la planta de la cual se obtuvo el extracto, la temperatura exacta usada, la sensibilidad de las plantas inoculadas a diferentes intervalos de tiempo y la población microbiana del jugo (18-31-36-41).

A pesar de los diversos factores que inciden en la variabilidad de las medidas descritas, se considera que el VF-1 tiene propiedades en tejido y en extracto que constituyen una evidencia adicional para pensar en que se trata del virus que incita el Mosaico Común o el Mosaico Amarillo del frijol, pero como el virus en estudio se transmite por la semilla, se descarta la posibilidad de que se trata de este último virus del frijol. Por otra parte la sintomatología presentada por la enfermedad motivo de este estudio, no corresponde en severidad de síntomas, lo mismo que su limitación al género Phaseolus a la descrita por el Mosaico Amarillo del frijol (61).

La purificación parcial del VF-1 se intento con objeto de comprobar

si el agente infeccioso en estudio correspondía o no a una nucleoproteína, y como un ensayo para la aplicación de un método de purificación posterior con el propósito de elaborar un antisuero para el VF-1. El método de purificación empleado por Scott (38) no fue lo suficientemente efectivo, ya que se perdió gran cantidad de material infectivo y será necesario introducirle algunas modificaciones con objeto de perfeccionarlo. Sin embargo, la preparación purificada resultó infectiva como lo demostraron las plantas de frijol Col 109-R que fueron inoculadas con ella y que desarrollaron idénticos síntomas a los de la enfermedad inducida por el VF-1 en extracto no clarificado. Los síntomas fueron más severos y se presentaron antes de lo corriente. En el análisis de esta preparación purificada en el espectrofotómetro se obtuvo un espectro de absorción típico de una nucleoproteína, con un mínimo y un máximo aproximados entre 240 y 260 milimicrones de longitud de onda. Es decir, se demostró que el VF-1 era una nucleoproteína infectiva. La curva obtenida se muestra quebrada por la existencia de otras sustancias que absorben luz a idénticas longitudes de onda; este hecho era de esperar, pues se trataba nada más que de un método de purificación parcial.

## CONCLUSIONES

El virus estudiado presenta los siguientes caracteres:

### I. Ambito de hospederos

A. Su ámbito de hospederos se reduce al género *Phaseolus*, más precisamente a *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. calcaratus*, *P. bracteatus* y *P. vulgaris*.

### II. Transmisión

A. Se transmite mecánicamente por frotación del extracto infeccioso sobre las hojas del frijol.

B. Se transmite por insectos

1. *Myzus persicae* S. lo transmite en el estilete

2. *Picturaphis brasilensis* no es vector

3. *Diabrotica balteata* no transmite el virus.

C. Se transmite por la semilla en porcentaje aproximados de 21-58%.

### III. Resistencia a la inactivación

A. Resiste un envejecimiento en tejido seco de hasta 4 días

B. Posee un punto final de dilución entre 1:1000 y 1:2000

C. Resiste un envejecimiento en extracto in vitro a 20° C de temperatura de 48 horas.

D. Su punto de inactivación termal está entre 59 y 60° C de temperatura por 10 minutos.

### IV. Purificación parcial del virus

A. El método de purificación descrito por Scott (38) no resultó bueno pues se pierde gran cantidad de material infeccioso.

B. Por análisis en el espectrofotómetro se determinó que el agente infeccioso en estudio era una nucleoproteína.

## RESUMEN

Se determinaron algunas propiedades de un virus que provoca una enfermedad común del frijol en la Provincia de Alajuela, Costa Rica.

La enfermedad es notable por un mosaico de las hojas trifoliadas, - que posteriormente se observa en bandas oscuras que corren paralelas a las nervaduras de la hoja. A veces, las hojas trifoliadas se presentan más angostas y acopadas hacia abajo y en general se percibe un menor desarrollo de la planta.

Diferentes especies de plantas se inocularon con este virus a fin de conocer su ámbito de hospederos. De todas las plantas probadas, sólo algunas de las que pertenecían al género Phaseolus se mostraron susceptibles al virus. Por otra parte, se inocularon también algunas variedades de frijol con el objeto de determinar su reacción varietal a la infección; se encontraron algunas variedades resistentes entre ellas: 27-R, Mex 24-N, S 89 N, S 182-N y Mex 27-N.

Se probó la transmisión por insectos, y el áfido Myzus persicae resultó un eficiente vector para este virus. Sin embargo, el áfido Picturaphis brasiliensis no demostró ser vector, al igual que un insecto masticador, el crisomélido Diabrotica balteata.

Para comprobar la transmisión de este virus a través de la semilla, se sembraron algunas semillas de variedades que en el campo presentaban un ataque severo de la enfermedad. Se comprobó su transmisión a través de la semilla en porcentaje desde el 21 al 58%.

Se determinaron algunas de las propiedades del virus en savia y en tejido disecado. En tejido seco el virus permanece infectivo entre 3-4 días; su punto de inactivación termal está entre 59 y 60°C por 10 minutos.

su punto final de dilución entre 1:1000 y 1:2000, más precisamente entre -- 1:1500 y 1:1700, y persiste infectivo en extracto in vitro a 20° C de tempe ratura por 48-52 horas.

Se intento además, efectuar una purificación parcial del virus usando clarificación con solventes orgánicos y centrifugaciones diferenciales. Se consiguió por el método usado una suspensión infectiva pero no muy con-- centrada. Dicha suspensión, analizada espectrofotométricamente demostró un espectro de absorción típico de una núcleoproteína.

En base a los resultados obtenidos en estos estudios, el virus es i dentificado como el virus del Mosaico Común del frijol.

SUMMARY

Some properties of a bean virus of common occurrence in Alajuela, Costa Rica, were studied.

The most remarkable symptoms of the disease caused by this virus are first a mosaic and later a pronounced vein-banding of the trifoliolate leaves, which appear sometimes narrow and cupped downwards. The plant is usually stunted.

The host range of the virus was found to be narrow; out of 33 species of plants mechanically inoculated with the virus only some of those belonging to the genus Phaseolus were found to be susceptible. Varieties of beans, P. vulgaris L., were also found to differ in their susceptibility.

Insect transmission tests showed that the aphid Myzus persicae Sulz is an efficient vector of the virus, which was not transmitted by the aphid Picturaphis brasiliensis Moreira or the chrysomelid Diabrotica balteata Leante.

Seed transmission was found to vary from 21 to 58% in different varieties of beans.

The stability of the virus in dried tissue and crude sap was studied. In dry tissue the virus remained infective for 3 to 4 days only. In crude sap, the thermal inactivation point was found to be between 59° C to 60° C, the dilution end point between 1:1500 and 1:1700, remaining the virus infective between 48 to 52 hours of ageing in vitro at 20° C.

A partially purified preparation of the virus was obtained after clarification of crude extracts with organic solvents, and differential centrifugation. The absorption spectrum of the preparation was found to be that of a typical nucleoprotein. On the basis of the results obtained, the virus is identified as common bean mosaic virus.

LITERATURA CITADA

1. ADLERZ, W. C. Factors affecting transmission of bean yellow mosaic virus. *Journal of Economic Entomology* 52(2):260-262. 1959.
2. AFANASIEV, M. M. y MORRIS, H. E. Bean virus 2 (yellow) on Great Northern bean in Montana. *Phytopathology* 42:101-104. 1952.
3. BAGGETT, J. R. Effects of genetic segregation in Phaseolus vulgaris on the symptoms induced by bean yellow mosaic virus. *Phytopathology* 47:365-368. 1957.
4. BAIN, D. C. Studies on southern bean mosaics in Mississippi (Abstract). *Phytopathology* 40:786. 1950.
5. BALL, M. E. Serology: techniques used in plant virus research. In Corbett, M. K. y Sisles, H. D., eds. *Plant virology*. Gainesville, University of Florida Press, 1964. pp. 235-252.
6. BOS, L., HAGEDORN, D. J. y QUANTZ, L. Suggested procedures for international identification of legume virus. *Tijdschrift over plantenziekten* 66(1960):328-343. 1960.
7. BRIDGMON, G. H. y WALKER, J. C. Gladiolus as a virus reservoir. *Phytopathology* 42:65-70. 1952.
8. BURKHOLDER, W. H. y MULLER, A. S. Hereditary abnormalities resembling certain infections diseases in beans. *Phytopathology* 16:731-737. 1926.
9. CARSNER, E. Susceptibility of various plantas to curly-top of sugar beet. *Phytopathology* 9:413-421. 1919.
0. \_\_\_\_\_ . Susceptibility of the bean to the virus of sugar beet curly top. *Journal of agricultural Research* 33(4):345-348. 1926.
1. CHEO, CHING. PEN. Effect of seed maturation on inhibition of southern bean mosaic virus in bean. *Phytopathology* 45:17-21. 1955.
2. CRISPIN, M. A. y GROGAN, R. G. Seed transmission of bean mosaic viruses. *Phytopathology* 51:452-456. 1961.
3. CRUMB, S. E. y MCWHORTER, F. P. Dusting beans against aphid vectors failed to give economic control of yellow bean mosaic. *Plant Disease Reporter* (32):169-171. 1948.
4. DANA, B. F. Resistance and susceptibility to curly top in varieties of common bean (Abstract). *Phytopathology* 30:786. 1940.
5. DEAN, L. L. y LA FERRIERE, L. Diseases of beans in Idaho. Idaho Agricultural Experiment Station. Bulletin 293. 1958. 19 p.

16. FAJARDO, T. G. Progress on experimental work with the transmission of bean mosaic (Abstract). *Phytopathology* 18:155. 1928.
17. \_\_\_\_\_. Studies on the mosaic disease of the bean (Phaseolus vulgaris L.). *Phytopathology* 20:469-494. 1930.
18. \_\_\_\_\_. Studies on the properties of the bean mosaic virus. *Phytopathology* 20:883-888. 1930.
19. GROGAN, R. G. A pod distorting strain of the yellow bean mosaic virus (Abstract). *Phytopathology* 38:10. 1948.
20. \_\_\_\_\_ y KIMBLE, K. A. The relationship of severe bean mosaic virus from Mexico to southern bean mosaic virus (Abstract). *Phytopathology* 52:12. 1962.
21. \_\_\_\_\_ y KIMBLE, K. A. The relationship of severe bean mosaic virus from Mexico to southern bean mosaic virus and its related strain in Cowpea. *Phytopathology* 54:75-78. 1964.
22. \_\_\_\_\_ y WALKER, J. C. A pod distorting strain of the yellow mosaic virus of bean. *Journal of Agriculture Research* 77(11-12):301-314. 1948.
23. HAGEDORN, D. J. y WALKER, J. C. The relationship of bean virus 2 to pea mosaic in Wisconsin. *Phytopathology* 40:684-698. 1950.
24. HANSON, E. W. y HAGEDORN, D. J. Red clover a reservoir of legume viruses in Wisconsin (Abstract). *Phytopathology* 42:467. 1952.
25. HARRISON, A. L. Transmission of bean mosaic. New York (Geneve) Agricultural Experiment Station. Technical Bulletin 236. 1935. 19 p.
26. JOHNSON, J. The classification of plant viruses. Wisconsin Agricultural Experiment Station. Research Bulletin 76. 1927. 19 p.
27. MURILLO, J. I. Estudio sobre virus del frijol en Costa Rica. Tesis Ingeniero Agrónomo. San José, Costa Rica, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. 1966. 79 p. (Mimeografiada)
28. MURPHY, D. M. A great northern bean resistant to curly top and common bean-mosaic viruses. *Phytopathology* 30:779-784. 1940.
29. NELSON, R. Transference of the bean mosaic virus by Macrosiphum solanifolii. *Science* 56(1447):342-344. 1922.
30. \_\_\_\_\_. Investigations in the mosaic disease of bean (Phaseolus vulgaris L.). Michigan Agricultural Experiment Station. Bulletin 18. 1932. 71 p.

31. PIERCE, H. W. Viroses of the bean. *Phytopathology* 24:87-115. 1934.
32. \_\_\_\_\_ y HUNGERFORD, C. W. Symptomatology, transmission, infection and control of bean mosaic in Idaho. Idaho Agricultural Experiment Station. Research Bulletin 7. 1929. 37 p.
33. PRICE, W. C. Strains, mutation, acquired immunity, and interference. In Corbett, M. K. y Sales, H. D., eds. *Plant virology*. Gainesville, University of Florida Press, 1964. pp. 93-114.
34. REDDICK, D. y STEWART, V. B. Transmission of the virus of bean mosaic in seed and observations on the thermal death point of seed and virus. *Phytopathology* 9:445-450. 1919.
35. \_\_\_\_\_ y STEWART, V. B. Varieties of beans susceptible to mosaic. *Phytopathology* 8:530-534. 1918.
36. ROSS, A. F. Identification of plant viruses. In Corbett, M. K. y Sisler, H. D., eds. *Plant virology*. Gainesville, University of Florida Press, 1964. pp. 68-91.
37. SEVERIN, H. H. y FREITAG, J. H. Some properties of the curly-top virus. *Hilgardia* 8(1):1-48. 1933.
38. SCOTT, H. A. Partial purification and serology of common bean mosaic virus (Abstract). *Phytopathology* 52:166. 1962.
39. SKOTLAND, C. B. Bean pod mottle virus of soybeans. *Plant Disease Reporter* 42(10):1155-1156. 1958.
40. \_\_\_\_\_ y BURKE, D. W. A seed borne virus of wide host range. *Phytopathology* 51:565-571. 1961.
41. SMITH, K. M. A textbook of plant virus diseases. 2d. ed. London, Churchill, 1957. 652 p.
42. \_\_\_\_\_. *Insect virology*. New York, Academic Press, 1967. 256 p.
43. SMITH, F. y HEWITT, W. Varietal susceptibility to common bean mosaic and transmission through seed. California Agricultural Experiment Station. Bulletin 621. 1938. 18 p.
44. STEWART, V. B. y REDDICK, D. Bean mosaic (Abstract). *Phytopathology* 7:61. 1917.
45. SWENSON, K. G. Aphid transmission of a bean yellow mosaic virus. *Journal of Economic Entomology* 47(6):1121-1123. 1954.
46. \_\_\_\_\_. Transmission of bean yellow mosaic virus by aphids. *Journal of Economic Entomology* 50(6):727-731. 1957.
47. THOMAS, H. R. y ZAUMEYER, W. J. Red node, a virus disease of beans. *Phytopathology* 40:832-846. 1950.
48. VIRGIN, W. J. An unusual bean disease. *Phytopathology* 33:743-745. 1943.

49. WALKER, J. C. Plant pathology. 2d. ed. New York, McGraw-Hill, 1957. 707 p.
50. WALTERS, H. J. A virus disease complex in soybeans in Arkansas (Abstract). *Phytopathology* 48:346. 1958.
51. \_\_\_\_\_ . Transmission of bean pod mottle virus by bean leaf beetles. *Phytopathology* 54:240. 1964.
52. \_\_\_\_\_ . Transmission of southern bean mosaic virus by the bean leaf beetle. *Plant Disease Reporter* 48(12):935. 1964.
53. WINGARD, S. A. Host and symptoms of ring spot, a virus disease of plant. *Journal of Agricultural Research* 37(3):127-153. 1928.
54. YERKES, W. y PATIÑO, G. The severe bean mosaic virus, a new bean virus from Mexico. *Phytopathology* 50(5):334-338. 1960.
55. ZAUMEYER, W. J. Transmission of bean mosaic virus by insects (Abstract). *Phytopathology* 23:40. 1933.
56. \_\_\_\_\_ . Transmissibility of certain legume-mosaic viruses to bean (Abstract). *Phytopathology* 23:39. 1933.
57. \_\_\_\_\_ y FISHER, H. H. Potentialities of southern bean mosaic in the field (Abstract). *Phytopathology* 41:567. 1951.
58. \_\_\_\_\_ y KEARNS, C. W. The relation of aphids to the transmission of bean mosaic. *Phytopathology* 26:614-629. 1936.
59. \_\_\_\_\_ y THOMAS, H. R. Pod mottle, a virus disease of beans. *Journal of Agriculture Research* 77(3):81-96. 1948.
60. \_\_\_\_\_ y THOMAS, H. R. Yellow stipple, a virus disease of bean. *Phytopathology* 40:847-859. 1950.
61. \_\_\_\_\_ y THOMAS, H. R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U. S. Department of Agriculture. *Technical Bulletin* 868. 1957. 160 p.
62. \_\_\_\_\_ y WADE, B. L. Mosaic diseases affecting different legumes in relation to beans and peas. *Phytopathology* 23:562-564. 1933.