

Los virus del frijol en Centroamérica. IV. Algunas propiedades y transmisión por insectos crisomélidos del virus del moteado amarillo del frijol^{*1/} ————— RODRIGO GAMEZ**

ABSTRACT

Bean yellow stipple virus (BYSV) was isolated from beans (Phaseolus vulgaris) in Turrialba, Costa Rica. Infected plants showed a distinctive yellow stippling and slight malformation of leaves. BYSV infected 14 of 24 mechanically inoculated species of Leguminosae. All of 542 cultivars of beans tested were found susceptible to the virus. No species outside Leguminosae were infected. The virus was not transmitted through seeds of infected plants. Properties in unbuffered sap were: thermal inactivation point between 74 and 76°C, longevity in vitro at 20°C between 24 and 48 hr, dilution and point between 10⁻³ and 10⁻⁴. BYSV was transmitted by the chrysomelid beetles Cerotoma ruficornis and Diabrotica balteata. Insects acquired the virus after feeding periods of 24 hr and retained transmissibility for up to 4 to 6, and 1 to 3 days respectively. The virus was purified from infected bean leaves by chloroform-butanol clarification and differential centrifugation in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0, and separated as a single centrifugal component after sucrose rate zonal density gradient centrifugation. Purified preparations were highly infective and contained numerous isometric particles, 26-30 nm in diameter. The absorption spectrum was typical of nucleoproteins with maximum and minimum at 260 and 240 nm, respectively. The A_{260/280} was 0.60 ± 0.02 and A_{260/240} was 0.70 ± 0.2, indicating nucleic acid content of 20 — 22 per cent. BYSV is serologically related but not homologous to cowpea chlorotic mottle virus, and is considered a strain of this virus and a member of the bromovirus group. — The author

Introducción

EL virus del moteado amarillo (VMA) fue originalmente aislado de plantas de frijol, *Phaseolus vulgaris* L. en Turrialba, Costa Rica. Las plantas infectadas mostraban un ligero moteado color amarillo y una leve reducción en el crecimiento. Estudios preliminares mostraron que el VMA era diferente de otros

virus transmitidos por insectos crisomélidos conocidos tanto en ésta como en otras partes del mundo (4, 17, 19). El VMA es relacionado serológicamente al virus del moteado clorótico del frijol de costa, "cowpea chlorotic mottle virus" (3), y por lo tanto, pertenece al grupo de los bromovirus (11). Originalmente había sido denominado virus del moteado clorótico (5), pero la similitud de los síntomas de las plantas infectadas y de otras de sus propiedades con las descritas por Zau-meyer y Thomas (18) para un virus denominado "bean yellow stipple virus" (BYSV), indujeron a utilizar la misma denominación en castellano. En el presente trabajo se describen algunas de sus propiedades en savia, modo de transmisión, reacción y ámbito de plantas hospedantes, y características de la partícula viral. Partes de este estudio fueron publicados en resumen (5, 7).

* Recibido para su publicación el 26 de abril de 1976

^{1/} Investigación financiada parcialmente por la donación 75-021 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica (CONICIT). El autor es becario científico del CONICIT.

** Centro de Investigación en Virología y Fisiología Celular, Instituto de Investigaciones en Salud, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria, Costa Rica

Materiales y métodos

Aislamiento del virus, transmisión mecánica y plantas hospedantes

El aislamiento del VMA utilizado en estos estudios se obtuvo de plantas de frijol en Turrialba, Costa Rica. El cultivar 'Col. 109-R' se utilizó como fuente de inóculo y planta de prueba. La transmisión del virus fue realizada rutinariamente en forma mecánica, y la determinación de plantas hospedantes se efectuó inoculando el virus a plantas de diferentes géneros y especies en la forma anteriormente descrita (9). Rutinariamente se intentó la recuperación del virus de plantas inoculadas que no mostraron síntomas de infección.

Propiedades en savia y transmisión por semilla

Las propiedades en savia del VMA fueron determinadas en la forma sugerida por Bos *et al.* (1). Para ese propósito, la infectividad de diferentes preparaciones se determinó basándose en el número de lesiones locales necróticas producidas por el virus en hojas primarias de *Dolichos lablab* L. El número y tamaño de las lesiones permitió la utilización de medias hojas para la comparación de preparaciones diferentes del virus (1, 15).

Las pruebas de transmisión por semillas se realizaron con el cultivar 'Col. 109-R.' Las plantas se inocularon en estado cotiledonal, recolectándose su producción al finalizar su ciclo vegetativo. Las semillas provenientes de las plantas infectadas se sembraron para observar en ellas la posible aparición de síntomas de infección del virus.

Transmisión por insectos crisomélidos

Los crisomélidos utilizados en las pruebas de transmisión pertenecían a las especies *Diabrotica balteata* Lec. y *Cerotoma usficornis* Oliv. Debido al hecho de no haberse logrado el establecimiento de colonias de estos insectos bajo condiciones controladas de invernadero, los insectos utilizados en todas las pruebas de transmisión provenían de colonias silvestres. *D. balteata* fue colectada en plantaciones de maíz y *C. usficornis* en plantaciones de *D. lablab*. Después de colectados los insectos se mantuvieron sobre plantas de frijol susceptibles al VMA a fin de probar si se hallaban libres del virus. Las pruebas de transmisión se realizaron utilizando procedimientos similares a los empleados en estudios anteriores (6, 8). Rutinariamente antes de las pruebas los insectos se sometieron a un período de ayuno de 24 hr, a fin de estimular su apetito y asegurar que todos ellos se alimentaran de las plantas infectadas durante el período de adquisición subsiguiente. Concluida la adquisición, los insectos se transfirieron inmediatamente a plantas sanas por períodos de diferente duración (períodos de prueba). Los insectos se probaban individualmente o en grupos de dos sobre plantas en estado cotiledonal. Los insectos no expuestos a plantas enfermas se denominaron sanos; los que transmitieron el virus se llamaron transmisores o virulíferos. El día en que se

inició una prueba de transmisión se denominó "1", "2" el día siguiente, y así sucesivamente.

Purificación

El VMA se purificó a partir de hojas de plantas de frijol, cultivar 'Col. 109-R' infectadas por el virus. Una cantidad de 100 g de hojas se mezcló con 100 ml de tampón de fosfato 0,01 M, pH 7,0 y se homogenizó en un homogenizador Sorvall. La pulpa resultante fue exprimida a través de tela de gasa, y el extracto así obtenido se mezcló a 4°C con partes iguales de cloroformo y butanol, bajo una leve y constante agitación para su emulsificación. La mezcla se mantuvo en reposo por 30 a 60 minutos a 4°C, rompiéndose la emulsión posteriormente por centrifugación a 5.000 rpm (3020 g) por 10 minutos en una centrífuga Sorvall RC2-B. La fase acuosa se centrifugó en el Rotor 30 de una centrífuga Beckman, Modelo L, a 30.000 rpm (105.651 g) durante 90 minutos. El sedimento resultante fue resuspendido en el tampón de fosfatos, clarificado por centrifugación a baja velocidad y centrifugado nuevamente a alta velocidad en la forma antes descrita. La preparación sedimentada del virus se resuspendió nuevamente en el tampón de fosfato, se clarificó a baja velocidad, y se usó posteriormente para centrifugación en gradientes de densidad de sucrosa. La misma solución tampón se usó para preparar soluciones que contenían 100, 200, 300 y 400 g de sucrosa por litro. Las columnas de gradientes de densidad se formaron colocando cuidadosamente y en forma sucesiva sin que se mezclaran, 4, 7, 7 y 7 ml respectivamente de las soluciones. Las columnas se prepararon en tubos de nitrato de celulosa de un Rotor SW 25,1 y se mantuvieron a 4°C por 16 hr, para permitir la difusión de la sucrosa. Un volumen de 2 ml de la preparación del virus se colocó sobre cada columna de sucrosa, agregándose luego cuidadosamente sobre ella el tampón hasta llenar completamente el tubo sin disturbar la columna. Los tubos se colocaron en el Rotor SW 25,1 y se centrifugaron a 22.500 rpm (73.018 g) durante 4 hr. Concluida la centrifugación, los gradientes se examinaron en un analizador y fraccionador ISCO de gradiente de densidades, conectado a un graficador externo (2). Se utilizó regularmente una fotocelda de 2 mm y un rango de sensibilidad de 0,05 a 254 nm de longitud de onda. En algunos casos se empleó una fotocelda de 10 mm al mismo rango de sensibilidad. La preparación del virus que se obtuvo fue concentrada por centrifugación a 30.000 rpm (105.651 g) durante 90 minutos en un Rotor R-30. El sedimento que contenía el virus se resuspendió en el tampón de fosfato.

Absorbancia y microscopía electrónica

El espectro de absorción del virus se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU-2, en un ámbito de 220-300 nm de longitud de onda. Las preparaciones fueron examinadas en un microscopio electrónico Hitachi HU-12. La suspensión del virus se mezcló con un volumen igual de ácido fosfotúngstico ajustado a pH 7,0 con hidróxido de potasio y se colocó sobre grillas de 400 mesh cubiertas con una membrana de colodión estabilizada con una película de carbón evaporado.

Serología

Para la preparación de antisueros del VMA se utilizaron preparaciones purificadas del virus, que se emulsificaron con adyuvante completo de Freund en la relación de 1 mg de virus/1 ml de adyuvante. Un volumen de 0,5 ml de la emulsión se inyectó dos veces a intervalos de una semana, en cada una de las patas traseras de un conejo. Los animales así tratados se sangraron tres semanas después de la última inyección. Los títulos de los antisueros así preparados, así como las relaciones serológicas, se determinaron por pruebas de precipitación de anillo y difusión en geles de Ouchterlony.

Los antisueros contra los virus de "cowpea southern bean mosaic" (CP-SBMV) "cowpea mosaic" (CPMV), "bean pod mottle" (BPMV), "cowpea chlorotic mottle" (CCMV), y "squash mosaic" (SMV), empleados en las pruebas de relaciones serológicas fueron suministrados por el Dr. J. P. Fulton, Universidad de Arkansas.

Resultados

Reacción de cultivares de frijol

Todos los cultivares de frijol, de un total de 542 probados, resultaron susceptibles al virus. Con ligeras diferencias entre cultivares, en general los síntomas típicos de infección se caracterizaron por un moteado en el cual áreas amarillas de forma irregular y bordes bien definidos, aparecían distribuidas irregularmente en la planta, (Fig. 1). Estas manchas amarillas disminuían en intensidad y número en las hojas formadas después de la floración de la planta. En la mayoría de los cultivares inoculados sólo se observó una ligera reducción en el crecimiento. El grupo de cultivares de frijol probados incluyó 'Stringless Green Refugee', 'Pinto 111',

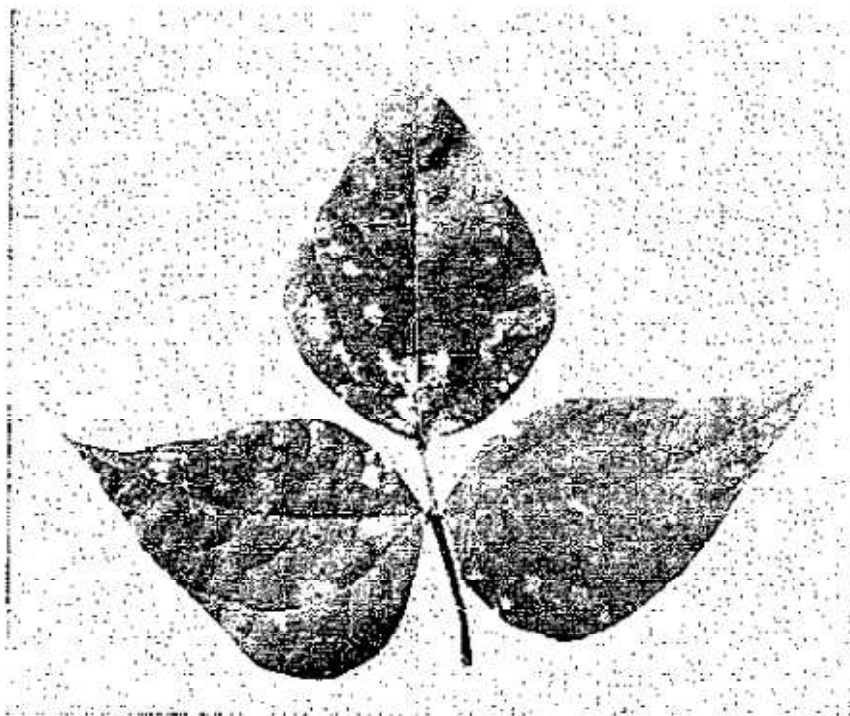


Fig. 1.—Síntomas del moteado amarillo en hojas de frijol.

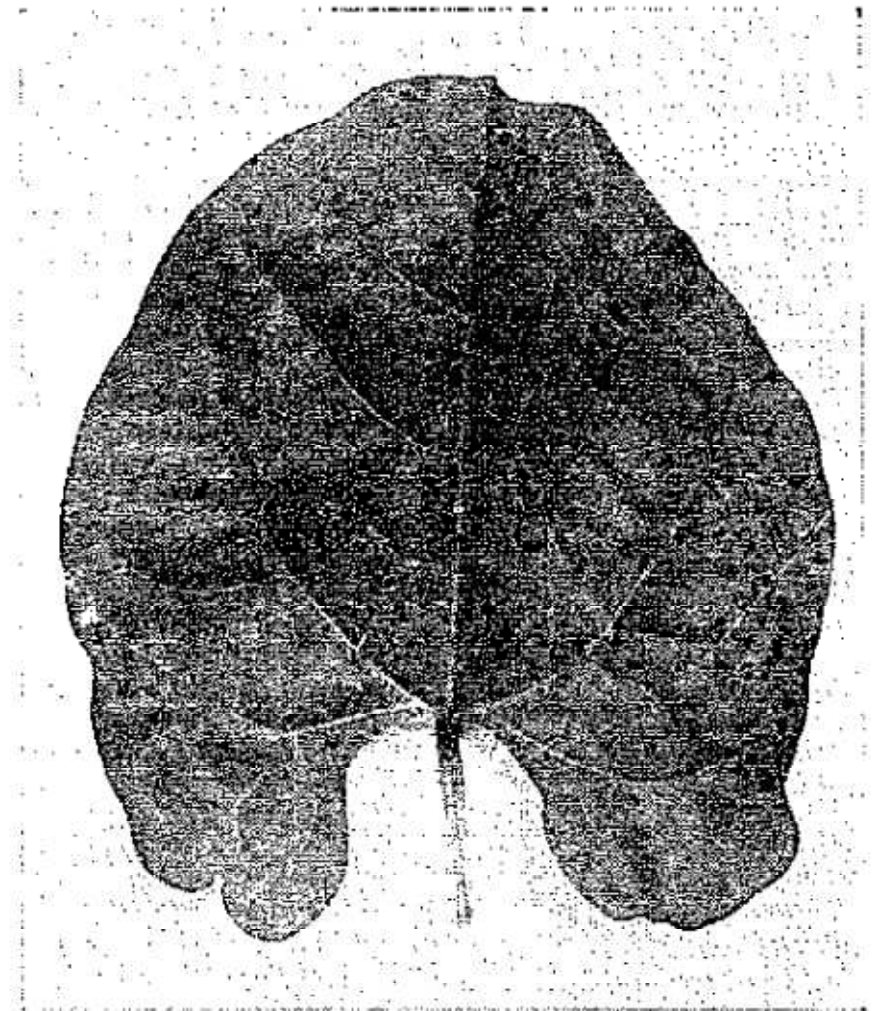


Fig. 2.—Lesiones locales necróticas causadas por el virus del moteado amarillo del frijol en hojas cotiledonal de *Dolichos lablab*.

'Bontiful', 'Michelite', 'Sanilac', 'Topcrop', 'Tendercrop', 'Tenderwhite', 'Tendergreen', 'Great Northern UI60', 'Kentucky Wonder' y 'Tenderlong'. Estos cultivares se han usado frecuentemente en estudios con otros virus (6, 8, 9, 18, 19), lo cual permitió la comparación del VMA con virus de leguminosas descritos en la literatura. Las reacciones aquí descritas fueron idénticas a las observadas por Zaunmeyer y Thomas (18) para el BYSV.

Plantas hospedantes y sintomatología

El número de hospedantes entre las leguminosas fue amplio. Las reacciones de diferentes géneros y especies hallados susceptibles se describen a continuación: *Phaseolus acutifolius* Gray y *P. lunatus* L., moteado amarillo; *P. calcaratus* Roxb., *P. vicariianus* Hart, *P. aconitifolius* Jacq. y *P. lathyroides* L., infección sin síntomas; *Vigna sinensis* Savi (6 cultivares), moteado amarillo severo; *V. sesquipedalis* (L.) Fr. Wirth, y *V. birta* Hook, moteado amarillo; *Glycine max* Merr. (cvs 'Improved Pelican', 'Bienville', 'Hardee', 'Hampton CES-407', 'CES-486 Stewart'), moteado amarillo; *G. javanica* y *Cajanus indicus* Spreng., infección sin síntomas.

Leguminosas que reaccionaron con la formación de lesiones locales sin ocurrir infección sistémica incluyeron: *Dolichos lablab* L. (Fig. 2), *G. max* (cvs 'Biloxi', 'Otootan', 'P1215-691'), *Crotalaria juncea* L. y *C. pantlina* L.

Otras especies de leguminosas inoculadas y halladas inmunes fueron: *P. angularis* (Willd) W. F. Wright, *P. mungo* L., *P. aureus* Roxb, *P. coccinens* L., *Vicia faba* Mild., *Trifolium repens* L., *T. hybridum* L.

Entre las especies no leguminosas inoculadas con el VMA, *Chenopodium amaranticolor* Coste y Reyn, y *Cb album* L. reaccionaron con la formación de lesiones locales blanquecinas. *Cucumis sativus* L., *C. melo* L., *Lycopersicon esculentum* Mill, *Datura stramonium* L., *Nicotiana tabacum* L. cv 'H-425', *N. glutinosa* L., *Pentunia hybrida* Vilm y *Physalis floridana* Rydb. fueron inmunes. El ámbito y reacción de plantas hospedantes del VMA es, con algunas pocas excepciones, similar al del BYSV (18), pero totalmente diferente a otros virus de leguminosas descritos en la literatura (16, 19).

Propiedades en savia

El VMA permaneció infeccioso después de ser calentado durante 10 minutos a temperaturas hasta 74°C pero fue inactivado a 76°C. Soportó un envejecimiento *in vitro* a 20°C de 24 pero no de 48 hr. El punto final de dilución se halló entre 10⁻³ y 10⁻¹. Los puntos de inactivación termal del VMA y del BYSV (18) son similares, no así su tolerancia a dilución y envejecimiento *in vitro*.

Transmisión por semilla

De un total de 406 semillas provenientes de plantas infectadas, ninguna de las plantas resultantes mostró síntomas de infección que indicaran transmisión del virus a través de la semilla.

Transmisión por crisomélidos

Para determinar si las especies *C. ruficornis* y *D. balteata* transmitían el virus, grupos de insectos sanos de ambas especies tuvieron separadamente un período de adquisición de 2 días. Concluida la adquisición los insectos se probaron sobre plantas sanas, en grupos de 2, por períodos de 2 días. El experimento se repitió 4 veces. De un total de 58 grupos de *D. balteata* probados, 15 transmitieron el virus; por otra parte 11 de 57 grupos de *C. ruficornis* fueron transmisores.

Se estudió también la retención del virus por las dos especies de crisomélidos. Los insectos tuvieron un período de adquisición de 2 días, siendo transferidos posteriormente en grupos de 2, a plantas sanas por 4 períodos consecutivos de 3 días de duración cada uno. Los resultados obtenidos aparecen en el Cuadro 1. Dos de los 15 grupos de *D. balteata* transmitieron el virus únicamente durante el primer período de prueba; por otra parte 5 de los 13 grupos de *C. ruficornis* lo hicieron en el primer período y 1 de 12 grupos en el segundo pero no en los restantes períodos. La retención del VMA en este caso fue al menos de 4 a 6 días de duración.

Cuadro 1 — Transmisión del virus del moteado amarillo por grupos de *Diabrotica balteata* y *Ceratomyza ruficornis*

Especie	Registro de Transmisión (Días de iniciado el experimento*)			
	3-5	6-8	9-11	12-14
<i>Diabrotica balteata</i>	2/15 ^{**}	0/11	0/14	0/11
<i>Ceratomyza ruficornis</i>	5/13	1/12	0/7	0/1

* Los insectos tuvieron un período de adquisición de 2 días y fueron transferidos a plantas sanas por 4 períodos consecutivos de prueba en los días indicados.

** Número de grupos transmisores / número de grupos probados. Dos insectos por grupos.

Sedimentación en gradientes de densidad

El VMA se sedimentó como un solo componente que apareció como un pico de mayor absorbancia de luz ultravioleta, a 3,2 cm debajo del menisco del tubo de la gradiente. En el extracto de planta sana no apareció ningún pico de absorbancia de luz ultravioleta. Las gradientes fraccionadas se utilizaron para determinar infectividad y características de las partículas virales.

Infectividad de las preparaciones

La infectividad de las fracciones obtenidas del analizador ISCO se determinó por inoculación a *D. lablab*. La fracción que contenía el componente asociado al pico de absorción de ultravioleta mostró ser infectiva, no así el resto de las fracciones obtenidas de las partes superiores e inferiores de la gradiente.

Absorción de la luz ultravioleta

Una muestra del componente infectivo se centrifugó a 105 000 g por 90 minutos en un Rotor R-40. El sedimento se resuspendió en la solución tampón de fosfatos 0,01M, pH7,0, y se examinó al espectrofotómetro. La preparación mostró un espectro de absorción típico de núcleo-proteínas, con un mínimo de 240 nm y un máximo a 260 nm. La tasa de absorbancia a 260/240, y a 280/260 fue de 0,70 ± 0,2 y a 0,60 ± 0,02, que sugiere un contenido de ácido nucleico de 20-22 por ciento para el VMA (13).

Microscopía electrónica

La muestra del componente infectivo utilizado en la determinación del espectro de absorción fue también examinada al microscopio electrónico después de su tinción.

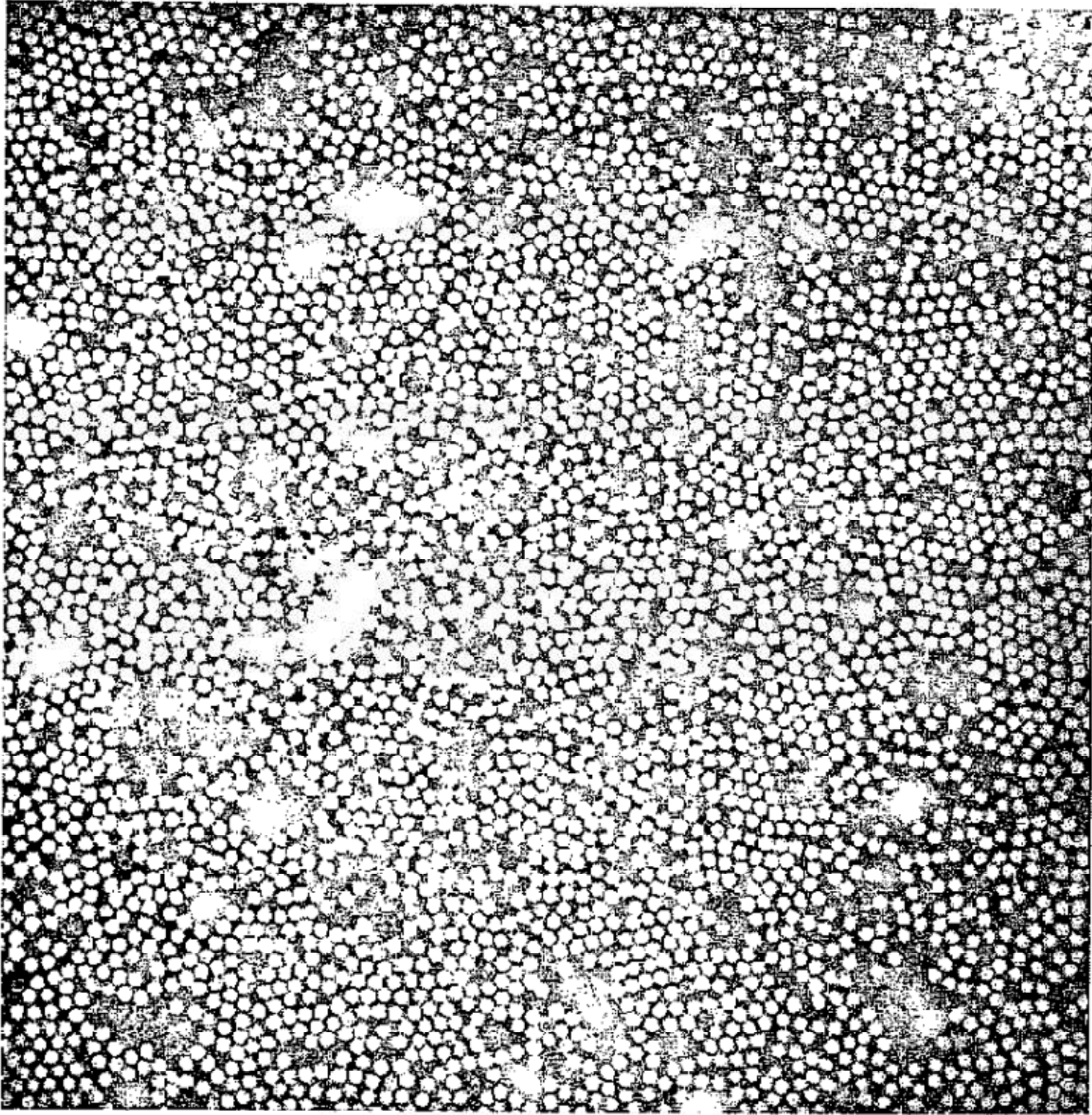


Fig. 3.—Partículas del virus del moteado amarillo del frijol (16 500 X)

con ácido fosfotúngstico, mostrando la presencia de partículas virales isométricas y de aproximadamente 26-30 nm de diámetro (Fig. 3). Las preparaciones de plantas sanas no contenían ninguna partícula.

Serología

El título del antisuero del VMA determinado por precipitación de anillo fue de 1/128. En pruebas de inmunodifusión doble en agar, este antisuero reaccionó específicamente con preparaciones purificadas o extractos crudos de plantas infectadas con el virus. Los extractos de plantas sanas no dieron ninguna reacción con el antisuero. Cuando el VMA se probó contra antisueños de los virus del CPMV, BPMV, CP-SBM, SMV y

CCMV, reaccionó únicamente con el CCMV en la forma anteriormente descrita (3). El antisuero del CCMV formó una banda de precipitación con un espolón final diferente a la banda de precipitación formada por el VMA y su antisuero homólogo, indicativo así de relación mas no de identidad serológica de ambos virus.

Discusión

La sintomatología y reacción de las plantas hospedantes, y el punto de inactivación termal del VMA son similares a los descritos por Zaunmeyer y Thomas (18) para el BYSV. Este virus fue originalmente aislado en 1950 de plantas de frijol en Illinois, U.S.A., y desde entonces no había sido hallado de nuevo por ningún

otro investigador. El aislamiento original del BYSV no está disponible, por lo que no pudo ser utilizado en pruebas comparativas con el VMA. No obstante la similitud de las características citadas de ambos virus indujo a mantener en castellano el nombre original de "bean yellow stipple virus".

La purificación del VMA permitió la determinación de algunas características intrínsecas de la partícula viral, y su comparación con otros virus de plantas (11, 16). Además de las propiedades en savia y su transmisibilidad por insectos crisomélidos, la forma y tamaño de la partícula, el contenido aproximado de ácido nucleico, la existencia de un solo componente centrifugacional en las preparaciones, las reacciones serológicas descritas anteriormente y comprobadas en este estudio, y el coeficiente de sedimentación de 81S (3), proveen criterio básico para establecer que este virus es un miembro del grupo de los bromovirus (11), serológicamente relacionado al CCMV (3, 13). El criptograma correspondiente (11) es entonces: */*:*/(20-22):S/S:S/Cl. La indicación de que serológicamente el CCMV y el VMA están relacionados pero no son idénticos, y las diferencias en el rango y reacción de las plantas hospedantes de estos virus permite considerarlos como razas diferentes de un mismo virus.

El VMA se ha encontrado en plantaciones de frijol de costa en diversas regiones de Costa Rica (10), pero su distribución en otros países de Centro América es aún poco conocida, aunque plantas con síntomas similares a los aquí descritos se han observado en El Salvador y Nicaragua.

Este constituye el tercer virus del frijol transmitido por insectos crisomélidos descrito en Centroamérica; el virus del mosaico rugoso (8) y el virus del mosaico sureño (14) habían sido anteriormente descritos como transmitidos por *D. balteata* y *C. varicornis*. Esta es la primera descripción de estas especies de insectos como vectores de un bromovirus.

Los resultados de los estudios preliminares sobre la transmisión del VMA por insectos no muestran diferencias apreciables en la eficiencia de transmisión del virus por *D. balteata* o *C. varicornis*. No obstante, esta última especie retiene aparentemente el virus por períodos más prolongados que *D. balteata*, al igual que sucede con el virus del mosaico rugoso (8). Para el VMA la eficiencia de transmisión no parece estar necesariamente ligada al tiempo de retención del virus, como se ha demostrado también en otros casos (4). El mecanismo de transmisión de virus por coleópteros ha sido exhaustivamente revisado (4), demostrándose, entre otras cosas, la asociación entre la presencia del virus en la hemolinfa con la transmisión y retención del virus por ese insecto vector. En el caso del VMA se requiere determinar si la baja eficiencia de transmisión y la corta retención del virus aquí observadas se asocian a su presencia en la hemolinfa de sus vectores.

Agradecimientos

El autor agradece a los señores Reynaldo Pereira y Guillermo Salazar su asistencia técnica, y al antiguo IICA-CIEI y la Unidad de Microscopía Electrónica del INISA-UCR, las facilidades prestadas para la realización de algunos aspectos de este trabajo.

Literatura citada

1. BOS, L., HAGERDON, D. J. y QUANTZ, I. Suggested procedures for international identification of legume viruses. *Tijdschrift over Plantensiekten* 66:328-343. 1960.
2. BRAKKE, M. K. Photometric scanning of centrifuged density-gradient columns. *Analytical Biochemistry* 5: 271-283. 1963.
3. FULTON, J. P., GAMEZ, R. y SCOTT, H. S. Cowpea chlorotic mottle and bean yellow stipple viruses. *Phytopathology* 65:741-742. 1975.
4. ———, SCOTT, H. S. y GAMEZ, R. Beetle transmission of legume viruses. In Bird, J. y Maramorosch, K., eds. *Tropical diseases of legumes*. New York, Academic Press, 1975. pp. 123-131.
5. GAMEZ, R. Los virus del frijol en Costa Rica. III. Moteado clorótico. In XV Reunión Anual. Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. San Salvador, El Salvador. Febrero 24-28, 1969. IICA. Publicación Miscelánea N° 68. p. 29.
6. ———. Los virus del frijol en Centro América. I. Transmisión por moscas blancas y plantas hospedantes del virus del mosaico dorado. *Turrialba* 21: 22-27. 1971.
7. ———. Some properties and beetle transmission of bean yellow stipple virus. *Phytopathology* 62:759. 1972. (Abstract).
8. ———. Los virus del frijol en Centro América. II. Algunas propiedades y transmisión por crisomélidos del virus del mosaico rugoso del frijol. *Turrialba* 22: 249-257. 1972.
9. ———. Los virus del frijol en Centro América. III. Razas del virus del mosaico común del frijol de El Salvador y Nicaragua. *Turrialba* 23:475-476. 1973.
10. GONZALEZ, C., MORENO, R. y GAMEZ, R. Identidad, incidencia y distribución de virus del frijol de costa (*Vigna sinensis*) en Costa Rica. In Resúmenes, Reunión Anual, División del Caribe, Sociedad Americana de Fitopatología. CIAT, Cali, Colombia, Diciembre 4-6, 1975. p. 45.
11. HARRISON, B. D., FINCH, J. I., GIBBS, A. J., HOLLINGS, M., SHEPHERD, R. J., VALENTA, V. y WETTER, C. Sixteen groups of plant viruses. *Virology* 45:356-363. 1971.
12. KUHN, C. W. Purification, serology and properties of a new cowpea virus. *Phytopathology* 54:853-857. 1964.
13. LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In Colowick, S. P. y Kaplan, N. D., eds. *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, 1957. Vol. III, pp. 447-454.

- 14 MURILLO, J. I. Estudio sobre dos aislamientos virosos del frijol en Costa Rica. In XIII Reunión Anual, Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. San José, Costa Rica. Febrero 28 - Marzo 4, 1967. pp. 52-55.
- 15 ROBERTS, D. Local lesion assay of plant viruses. In Corbett, M. K. y Sisler, H. D., eds. Plant virology. University of Florida Press, 1964. pp. 194-210.
- 16 SMITH, K. M. A textbook of plant virus diseases. New York, Academic Press, 1972. 684 p.
- 17 WALIERS, H. J. Beetle transmission of plant viruses. *Advances in Virus Research* 15:339-363. 1969.
- 18 ZAUMEYER, W. J. y THOMAS, H. R. Yellow stipple, a virus disease of bean. *Phytopathology* 40:847-859. 1950.
- 19 ————. A monographic study of bean diseases and methods for their control. Washington D. C. United States Department of Agriculture. Technical Bulletin 868. 1957. 255 p.