

## Metodologías para la extracción de virus provenientes de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.).

Z.M. Peña P.<sup>1</sup> y G. Trujillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones Agropecuarias del estado Lara. Apdo. postal 592.

<sup>2</sup>Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Apdo. postal 4579, Maracay, estado Aragua.

### Resumen

En Venezuela desde 1980 se ha señalado la presencia de microorganismos patógenos como bacteria, hongos y virus en la mayoría de las semillas de leguminosas estudiadas, incluye: comercial, registrada, fundación, experimental; y los métodos empleados para garantizar la sanidad de la semilla, no incluyen pruebas que permitan extraer los virus, no existen registros ni conocimiento en general de la introducción de enfermedades virales vía semilla en nuestro país, a pesar de la relevancia de esta forma de transmisión. Más del 50% de las enfermedades importantes en caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y en frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) más de 15 virus, se transmiten por semillas. Por ello, se tomó un volumen de 53 muestras de semillas de caraota y frijol tipo experimental, certificada y común provenientes de los Estados Aragua, Falcón, Guarico, Lara, Portuguesa, y Sucre así como de Argentina, Chile, Colombia, Canadá y USA; para ser procesadas en la extracción de virus. Empleando dos protocolos, el primero, la observación de síntomas virales en la primera hoja trifoliada plenamente expandida y el segundo, la inoculación mecánica de plantas indicadoras con harina de semillas; ambos confirmaron la presencia de virus. En caraota tipo experimental el 25% resultaron con infección viral, en caraota certificada el 28,6%, en caraota común el 23,1% y en semilla importada en el 16,6% presentó infección viral. En cuanto a frijol, se detectó infección viral en semilla común (55,5 %). Las metodologías comprueban el porcentaje de infección viral del material de siembra de diferentes áreas del país y su aplicación conducirá a establecer controles que impidan la diseminación y uso de material con un alto grado de contaminación viral.

**Palabras clave:** virus, transmisión por semilla, extracción, fabaceas.

## Introducción

Las fabáceas comestibles que tradicionalmente se producen en Venezuela en orden de importancia son: caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y fríjol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), que representan una fuente importante y económica de proteína, principalmente para los grupos sociales de escasos recursos; quienes las consumen en forma masiva y popular, y por su adaptabilidad a gran variedad de condiciones agroclimáticas, se les confiere grandes perspectivas a nivel nacional. Quizás la dramática reducción del cultivo de leguminosas de grano en Venezuela (con 83% en caraota y 43% en fríjol), sea la muestra más fehaciente del fracaso de la agricultura venezolana, dada la importancia cualitativa de esas especies como fuentes de proteínas para la población, en general, y para el sector con menos recursos, en particular. Como consecuencia de rendimientos prácticamente estancados y áreas cosechadas decrecientes, la producción de leguminosas graneras se redujo entre 1988 y 2001, pasando de 31.376 a 9.356 t (70%) en caraota y de 11.986 a 7.867 t (34,4%) en fríjol (12).

A pesar de la adaptabilidad a una gran variedad de condiciones agroclimáticas, en el país se ha señalado que la producción de fabáceas venido disminuyendo gradualmente en los últimos años (15). Esto debido a que la mayoría los productores de fabáceas utilizan como material de siembra, semillas de su cosecha anterior o intercambian entre sus vecinos, llegándose al extremo de utilizar grano de con-

sumo como semilla (17); también los granos que se importan para consumo, son utilizados como semilla; esto favorece, entre otras cosas, la proliferación de enfermedades, sobre todo aquellas transmitidas por semilla, circunstancia que evidentemente permite su perpetuación de una generación a otra, jugando este tipo de transmisión un papel importante en la epidemiología de las enfermedades (13).

En Venezuela se ha señalado desde 1980 la presencia de microorganismos patógenos como bacteria, hongos y virus en la mayoría de las semillas de fabáceas estudiadas, incluyendo: Certificada, Registrada, Fundación y Experimental (20). Los protocolos que se aplican para detectar la sanidad de la semilla, en el ámbito de introducción de materiales, no han incluido hasta el presente pruebas que permitan detectar virus. Aquellos virus transmitidos por semilla pueden detectarse por medio de pruebas de germinación, que consiste en sembrar muestras representativas de las semillas, lo suficientemente grande (100 semillas) en bandejas o materas, para evaluar visualmente la manifestación de síntomas virales en al menos una plántula a los 15 a 30 días después de sembradas (16). A nivel nacional se ha determinado el porcentaje de transmisión a partir de semillas de tres cultivares de fríjol (7). En otro estudio se recomienda la siembra de semillas y evaluación de los síntomas virales, para luego separar las muestras sospechosas de virus; señalándose que esta metodología tar-

da, por lo menos, dos semanas para obtener resultados y que se requiere de cierta infraestructura como cobertizos a prueba de insectos y temperaturas controladas; sin embargo, hasta el momento éste parece ser el método más sencillo y más económico para determinar la presencia o no de virus en la semilla (20).

Otra metodología que ha sido aplicada para corroborar la transmisión de virus es el uso de harina de semillas infectadas, como inóculo fue empleada esta metodología usando fabáceas (10, 21), obteniendo una alta infección tanto en plantas donde se emplea inóculo a base de harina fresca, como harina que se mantuvo almacenada durante 31 meses a  $-2^{\circ}\text{C}$ ; con la harina se prepara el inóculo en forma de pasta, mezclando, una parte de harina por dos partes de agua destilada (5).

Estas metodologías presenta algunas ventajas, principalmente de tipo práctico sobre los métodos tradicionalmente usados en inoculaciones mecánicas. En la mayoría de los casos la expresión de síntomas es evidente en las plantas enfermas; excepto algunos virus no inducen síntomas visibles en todos los genotipos o en ciertas condiciones ambientales, haciendo necesaria la indexación de plantas de fabáceas mediante plantas indicadoras susceptibles a virus (8, 18, 19).

Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, se realiza el siguiente trabajo de investigación, que tiene como objetivo evaluar metodologías para la extracción de virus provenientes de semillas de fabáceas, específicamente en caraota y fríjol, que puedan ser implementados en forma fácil y segura.

## Materiales y métodos

**Ubicación del ensayo.** La investigación se realizó un umbráculo protegido contra insectos y bajo condiciones controladas del laboratorio de Virología Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

**Material utilizado.** De los principales estados productores de caraota y fríjol del país (Aragua, Falcón Guárico, Lara, Portuguesa y Sucre) se colectó un total de 53 materiales usados como semilla, para determinar a través de la extracción, la incidencia de virus que se transmiten por semilla. Los materiales fueron clasificados de acuerdo a su origen, de la siguiente forma:

**Semilla experimental de caraota.** Se evaluaron 8 materiales de producción experimental o semilla producto de la selección de materiales promisorios, provenientes de evaluaciones de líneas avanzadas y variedades, procedentes del programa de mejoramiento del INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas).

**Semilla certificada de caraota y fríjol.** Se evaluó un lote de 9 materiales de semilla de la empresa privada, constituida por semilla básica o de fundación, semilla registrada, sometida al proceso de certificación y que cumple con los requisitos establecidos para estas catego-

rías por el Servicio Nacional de Semillas (14).

**Semilla común de caraota y frijol.** Se evaluaron 22 materiales utilizados como semilla producto de la cosecha anterior de materiales locales, representado por semilla sin identificación, normalmente usada por los productores en las diferentes zonas productoras de fabáceas comestibles del país.

**Semilla importada de caraota y frijol (granos).** En este estudio se define el término semilla importada, como aquellos materiales que en la actualidad se siembran en algunas áreas productoras del país; la mayoría de estos materiales en realidad son granos que se encuentran en el mercado para consumo humano, y son tomados por los productores como semilla; se evaluaron 14 materiales procedentes del exterior (Argentina, Chile, Colombia, Canadá y USA) que fueron facilitados por casas comerciales.

**Mantenimiento de las plantas.** En todos los ensayos se realizaron dos riegos diarios, cada ocho días se hicieron aspersiones con abono foliar líquido y con plaguicidas.

**Protocolo I: Observación de síntomas en la primera hoja trifoliada de plantas de caraota y frijol**

Se evaluaron 400 semillas por cada una de las muestras de los tipos señalados; utilizándose dos bandejas germinadoras por muestra. Las bandejas previamente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%; se colocaron las semillas y se cubrieron con una delgada capa de sustrato (aserrín de coco y tierra negra).

### **Evaluación de síntomas.**

Cuando la primera hoja trifoliada emitida logró la plena expansión de su lámina se determinó el porcentaje de plantas infectadas con virus, evaluando la presencia de síntomas virales de acuerdo a una escala basada en la clave para identificar virus en fabáceas de Boswell y Gibbs (2), luego los síntomas fueron reproducidos, mediante inoculación mecánica sobre plantas sanas de la misma variedad.

### **Protocolo II: Inoculación con harina de semillas de caraota y frijol**

Para esta prueba se procedió a obtener la harina de los materiales de caraota y frijol de los tipos: certificada, experimental, común e importada. Con cada muestra de harina procesada se inocularon ocho plantas por cada indicadora utilizada, para un total de 40 plantas por muestra.

**Obtención de la harina usada como inóculo.** Se utilizó la metodología de Cafati (5) con ciertas modificaciones, se molieron 72 g de semilla (promedio del peso de 400 semillas) en un procesador de alimentos por 10 min., luego se filtró a través de tela de organza y se obtuvo un polvo muy fino que fue la harina empleada en la inoculación de plantas de caraota, frijol y indicadoras de virus; en dilución 1:5 (p/v) de harina y agua destilada estéril, se agitó y se centrifugó a 3000 g por 10 min., y se tomó el sobrenadante como inóculo.

**Inoculación y mantenimiento de las plantas.** Se inocularon plantas jóvenes con 7 días de emergidas, frotando el sobrenadante

sobre las hojas primarias simples, previamente espolvoreadas con carborundo de mallado 600; el exceso de inóculo se lavó con agua destilada.

**Detección y cuantificación de la sintomatología viral.** Se evaluó la presencia de síntomas virales y el porcentaje de plantas con virus entre los 5 a 14 días después de la inoculación.

**Reproducción de los síntomas virales por inoculación mecánica.** En la multiplicación de la sintomatología viral se empleó la metodología de French y Hebert (9), se inoculó con jugo crudo de la muestra enferma un lote de 48 plantas sanas de 7-10 días de emergidas de la misma variedad. Para obtener el jugo crudo de tejido enfermo, las hojas se pesaron y, se cortaron finamente, luego se maceró en un mortero frío esterilizado, en presencia de buffer fosfato de potasio, a pH 7,5 y 0,1 M, en proporción de 1:4 (p/v). Las plantas con solo sus hojas primarias (siete días de edad), fueron espolvoreadas con el abrasivo carborundo de mallado 600, y con la punta del dedo índice impregnado con inóculo se realizaron

tocamientos en toda el área de la hoja primaria; luego, con agua destilada se lavaron las hojas inoculadas, a fin de eliminar restos del inóculo. Como control negativo se inocularon 5 plantas solo con agua destilada. Se realizaron tres evaluaciones a los 5, 10 y 15 días después de la inoculación.

De igual forma se procedió a evaluar la sintomatología viral sobre las diferentes plantas indicadoras. Se inocularon mecánicamente cuatro plantas por indicadora seleccionada, basados en que la mayoría de los virus infectan a una o más de estas especies (2, 11). Las plantas indicadoras utilizadas fueron: *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn., *Ch. quinoa* Willd. *Nicotiana tabacum* L., *N. glutinosa*, *Cucumis sativus* L., *Vigna unguiculata* L. Walp, *Phaseolus vulgaris* L. y *Gomphrena globosa* L. (2, 9).

En el caso de fabáceas la inoculación se realizó a los 7 días de edad y en las plantas indicadoras de otras familias se realizó en plantas de 20 días de edad. Se realizaron tres evaluaciones de los síntomas a los 5, 10 y 15 días después de la inoculación.

## Resultados y discusión

**Porcentaje de plantas enfermas por tipo de semilla.** De los 53 materiales de siembra evaluados el 22,5% de las muestras de caraota y 38,5% de las muestras de frijol estudiadas manifestaron síntomas virales. Cuando se evaluó el comportamiento de las semillas de caraota de acuerdo al tipo, con el protocolo I, en caraota se obtuvo un alto porcentaje de infec-

ción viral en semilla certificada (28,6%) sí se le compara con el obtenido para semilla experimental (25%), semilla común (23,1%) y semilla importada (16,6%). En el caso de frijol, se obtuvo un alto porcentaje de infección viral en semilla común (55,5%); no se evaluó semilla experimental, en semilla certificada e importada de frijol no se detectó infección viral, aun-

que el número de muestras utilizadas fue pequeño para llegar a una conclusión definitiva. Sin embargo, al calcular el total de plantas con infección viral por muestras de caraota y fríjol, se observó que, los valores obtenidos para semilla certificada de caraota se están por debajo del 2% cumpliendo este valor con los requisitos exigidos para el virus del mosaico común de la caraota (BCMV) en las normas para certificación del Servicio Nacional de Semillas, específicamente (14); valores altos de infección viral fueron obtenidos en semilla común (6,06 hasta 20,2%), semilla experimental (5,53 hasta 12,64%) y semilla importada (2,19 hasta 11,47%).

**Efectividad de los protocolos propuestos.** La aplicación de los dos protocolos para la detección de virus que se transmiten a través de semilla, permitieron determinar el porcentaje de infección viral presente en el material de siembra evaluado. La aplicación de métodos de detección de virus que se transmiten a través de semilla ("growing-on test"), han resultado eficaz para reducir de forma sustancial la infección en los lotes de semilla comercial (1). Aunque, se han indicado limitaciones en el método como: la interacción entre cepas de virus, que algunos cultivares resulten con síntomas no visibles, debe disponerse de un tiempo entre 15 a 20 días para observar los síntomas y espacio suficiente, el procedimiento es lento (13-19 días) y no detecta la infección en las variedades tolerantes a virus (16). No deja de ser cierto que ambos protocolos, hoy en día son poco aplicados dada la existencia de otras téc-

nicas de detección más sensibles y rápidas como el ELISA (Enzyme Linked Immuno sorbent Assay). A pesar de las limitaciones, estas metodologías pueden ayudar a detectar material con un alto grado de infección viral y podrían ser aplicadas por los organismos encargados de garantizar la sanidad de la semilla, donde no se disponga de recursos para la adquisición de equipos.

**Protocolo I. Pro y contras a la aplicación de esta metodología.** Los porcentajes de plantas detectadas con virus, con el uso de esta metodología, resultan importantes, ya que se tiene el índice de la transmisibilidad del virus (9). Con el protocolo I solo se evaluaron síntomas de plantas que demuestran infección cuando su expresión era evidente, resultando este hecho una desventaja al no poderse detectar los virus latentes o enmascarados; aunque se afirma que es poco frecuente el enmascaramiento de síntomas en este tipo de pruebas o "growing-on test" (6). La literatura hace referencia con mayor énfasis al protocolo I (1, 16), esto permite inferir que es el más empleado.

**Protocolo II. Pro y contras a la aplicación de esta metodología.** Al comparar las dos metodologías que, a pesar de ser diferentes, no deja de ser relevante el hecho que ambas permiten obtener un índice de la transmisibilidad del virus llevado en la semilla evaluada. Con el Protocolo II se evalúa el porcentaje de infección por muestra y no por planta como en el protocolo I. Además, se detectan virus caracterizados, porque una gran parte de su actividad es retenida en

tejido seco, dado que los mismos sobreviven a la desecación de las testas por largos periodos; quedando en evidencia al utilizar la harina de semilla como inóculo, dándose la posibilidad de detección estos virus. Esto es corroborado por McKinney, quien indicó que el virus del mosaico de la avena se trasmite difícilmente cuando se usaron extractos de tejidos frescos, y presenta una ligera actividad después de la desecación; mientras que, la harina preparada de semillas infectadas, de cosechas recientes, provee una eficiente fuente de inóculo de virus, demostrando la alta eficiencia en la transmisión a través de semilla al lograr detectar mayor cantidad de muestras infectadas al utilizar harina de semilla como inóculo (21). La aplicación del protocolo II presenta ciertas ventajas, principalmente de tipo práctico, sobre los métodos tradicionales de inoculación, ya que se puede guardar el inóculo por un tiempo prolongado, al adicionarle sustancias preservantes, puede ser empleado en cualquier momento, es económico, simple y fácil; y asegura un alto porcentaje de transmisión. Entre las limitaciones esta: la interacción entre cepas de virus, lo cual requiere espacio por el número de plantas a evaluar, disponer de 15 a 20 días para observar los síntomas, ya que entre producir un plantel de plantas indicadoras y comenzar a observar los síntomas se requiere unos 20 días aproximadamente; mientras que en el Protocolo I se lleva unos 16 días.

**Comportamiento de los hospedantes.** El emplear una serie de hospedantes diferenciales en el Pro-

toloco II, permite identificar virus que permanecen ocultos y definir variantes del mismo (18). Aunque, las condiciones ambientales y las distintas combinaciones de hospedante/virus, influyen en la expresión de los síntomas, es necesario mantener los umbráculos donde se encuentran estas plantas, libre de plagas para garantizar los resultados (9). Las especies de fabáceas y quenopodiáceas mostraron síntomas virales, es importante resaltar que, *P. vulgaris* y *V. unguiculata* constituyen las indicadoras principales, por ser susceptibles a todos los virus que afectan a caraota y frijón conocidos hasta el presente (2). Las fabáceas usadas en este estudio fueron *P. vulgaris* var. 'Tacarigua' y *V. unguiculata* var. 'Apure', ya que pueden cultivarse con facilidad, aminorando el tiempo de realización de la prueba; Entre las quenopodiáceas empleadas, *Ch. quinoa* mostró mayor número de lesiones locales en un corto tiempo. Es de resaltar que, las quenopodiáceas y *D. stramonium* son hospedantes complementarios que permiten aislar los virus y ayudan en la posible identificación, razón por la cual han sido empleadas en numerosos trabajos (2, 3, 4, 9, 11).

**Consecuencias epidemiológicas.** En estos resultados se refleja la calidad, en cuanto a sanidad fitosanitaria, que posee el material de siembra que se están utilizando. La semilla común presenta altos porcentajes de infección, al compararse con los obtenidos para semilla certificada nacional, y estas diferencias son lógicas ya que, para su producción no recibe ningún tipo de control como ins-



pecciones y raleo de plantas enfermas con virus; esta semilla, generalmente, proviene de siembras anteriores. En cuanto a la semilla experimental, los resultados obtenidos indican que para su producción, las inspecciones, eliminación de planta enfermas, control de vectores, etc.; han resultado poco eficiente como medidas fitosanitarias; mientras que, en la semilla importada se obtuvieron los mayores porcentajes de infección viral, lo que permite decir que, al sembrarse granos que entran al país para consumo, se promueven las enfermedades virales e incrementa su incidencia en las áreas productoras de fabáceas, además, queda abierta la posibilidad de aparición de algunas virosis no reportadas en el país. Altos porcentajes de infección viral pueden afectar los cultivos de una manera drástica con pérdidas económicas, al causar las epidemias, formadas por un complejo ecológico en el cual los virus, los vectores, las plantas y el ambiente juegan un papel fundamental. Con

la aplicación de estas metodologías de detección, los porcentajes de infección viral detectados a través de la observación de la sintomatología, no dejan de ser relevantes, ya que se trata de semillas y material utilizado para este fin, que se encuentra distribuido en las principales áreas productoras e indican la amenaza potencial de los virus, y de su extensión hacia nuevas áreas. Besnier (1) señala que las semillas juegan un papel importante en la introducción de nuevas enfermedades en un territorio, sin embargo, no es posible en la práctica prohibir la entrada, porque una medida tan radical, aparte de provocar graves perturbaciones en el comercio internacional, resultaría ineficaz en la mayoría de los casos; ya que pueden ser introducidos por otros medios menos controlados; cabe citar que la introducción de granos como cereales, fabáceas y oleaginosas, pueden ser utilizados como semillas, aunque no se destinen para la siembra, en algunas ocasiones, éste puede ser su fin último.

## Conclusiones y recomendaciones

Las metodologías empleadas en este estudio, permiten conocer en lotes de semillas la presencia de virus, resultando bastante sencillas, fácil y de bajos costos sí se cuenta con las condiciones mínimas para su ejecución.

La semilla certificada nacional presentó infección viral, aunque sus porcentajes fueron los más bajos, lo que permite decir que los controles exigidos para su producción se realizan, dando garantía a los productores nacionales para su utilización.

Con relación a la semilla experimental, el alto porcentaje de infección viral, indica que las prácticas para el control en campo han resultado poco eficientes; en la semilla común la presencia de virus es de esperarse, ya que generalmente, proviene de siembras anteriores sin ninguna selección; con relación al grano importado, los porcentajes de infección viral resultan alarmantes, por lo que los mismos no deben ser usados como semillas.

La ejecución de las metodologías



empleadas en este estudio, por los organismos encargados de garantizar la sanidad de la semilla, permitirá detectar y tomar las acciones necesarias

que garanticen la calidad fitosanitaria del material de siembra antes que el mismo sea llevado al campo.

## Literatura citada

- Besnier, R. F. 1989. Ensayos fitosanitarios. Cap. 20: Semillas, biología y tecnología. Ediciones Mundiprensa, Madrid, España, 540 p.
- Boswell K. F. y A. J. Gibbs. 1983. Viruses of Legumes 1983. Descriptions and keys from vide. Research School of Biological Sciences. Australia. 117-123 p.
- Bruening, G. 1989. En: Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson, y E. J. Zurcher. 1997. Plant viruses on line: Descriptions and lists from VIDE database. Version 16 th. January (eds.) (1996 Onwards) URL. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vid>
- Büchen-Osmond, C. 1998. Plant viruses on line: Descriptions and lists from DELTA-Format. Abril, 1998 .<http://ife.anu.edu.au/viruses/ICTVdB/1801000.htm>.
- CAFATI, K. 1968. Inoculación de frijoles con *Phaseolus Virus 1* a partir de harina de semillas de plantas enfermas. Rev. Agric. Téc. (Santiago) 28:130-131.
- De Tempe, J. y J. Binnerts. 1979. Introduction to methods of seed health testing. Seed Sci. & Technol. (7): 601-636.
- Debrot, E., M. Alfaro, E. Brown, y F. Centeno. 1993. Detección de un virus transmitido a través de la semilla de frijol (*Vigna unguiculata*). XIII Congreso Venezolano de Fitopatología. Fitopatol. Venez. 6 (2): 66.
- Fonturbel, F. 2001. Los vitropatógenos: consideraciones generales, detección y eliminación. Rev. Biología. org. N° 6, octubre.
- French, E. y T. Hebert. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 135 p.
- George, J. A. 1962. A technique for detecting virus-infected montmorency cherry seeds. En: WILSON, V. E. and L.L. DEAN, 1964. Flour of infected bean seed as source of virus. Phytopathology 54: 489.
- Hampton, R., L. Beczner, D. Hagedorn, L. Bos, T. Inouye, O. Barnett, M. Musil y J. Meiners. 1978. Host reactions of mechanically transmissible legume viruses of the northern temperate zone. Phytopathology 68: 989-997.
- Marin, D. 2002. Rendimiento y producción agrícola vegetal: un análisis del entorno mundial (1997 - 1999) y de Venezuela (1988 - 2001). Rev. Agroalim. V. 15, Mérida.
- Maury, Y., C. Duby y R. K. Khetarpal. 1998. Seed certification for viruses. Cap 18. p. 237. En: HADIDI, A., R. K. KHETARPAL and H. KOGANEZAWA. Plant virus diseases control. American Phytopathological Society. Minnesota, USA. p. 1034.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA. 1986. Servicio a la producción. Normas generales sobre semillas. Cap. III, p. 3.: De la certificación de semillas. Artículo 13. Gaceta Oficial de la República de Venezuela. Núm. 33.456. Caracas, Venezuela.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA. 1997. El reto de la

- agricultura Venezolana: Dificultades y opciones. Dirección General Sectorial de Planificación y Políticas. Caracas, Venezuela. 123 p.
16. Morales, J. F. 1983. El mosaico común del frijol: Metodología de investigación y técnicas de control. Edición revisada. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, 26 p.
  17. Morros, M.E. 2001. Cultivo de la caraota con énfasis en el estado Lara. Maracay, Ven., Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara. 74 p.
  18. Sarasola, A. y M. S. Rocca. 1975. Fitopatología. Primera Edición, Editorial Hemisferio sur. Argentina, 192 p.
  19. Schwartz H. y F. Morales. 1994. Patología de la Semilla. Cap. 19. p. 473-494. En: Corrales, M. y F. Howard. Problemas de la producción del frijol en los trópicos. Centro Internacional de la Agricultura Tropical. Segunda Edición Cali, Colombia.
  20. Trujillo G. 1989. La problemática de las semillas de leguminosas comestibles en relación con los patógenos de planta en Venezuela. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Rev. Agronomía al día, 3: 30.
  21. Wilson, V. E. y L.L. Dean. 1964. Flour of infected bean seed as source of virus. *Phytopathology* 54: 489.