



***Aphelenchoides besseyi* Christie (Nematoda: Aphelenchoididae), agente causal del amachamiento del frijol común**

Néstor Chaves¹, Emilio Cervantes², Iñigo Zabalgozcoa² & Carlos M. Araya³

¹Programa de Leguminosas, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica, Apdo. Postal 183-4050, Alajuela, Costa Rica; ²Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), Apartado 257, 37071, Salamanca, España; ³Laboratorio de Fitopatología, Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Costa Rica, Apdo. 86-3000, Heredia, Costa Rica

Autor para correspondencia: Néstor Chaves, e-mail: nfchaves@gmail.com

RESUMEN

La identificación del agente causal del amachamiento se llevó a cabo de diciembre de 2008 a noviembre de 2009 mediante cuatro pruebas: análisis para detectar ARN de doble cadena (dsRNA) de origen viral, DAS-ELISA, cumplimiento de los postulados de Koch y prueba de patogenicidad. El análisis para la detección de dsRNA reveló la presencia de dos bandas de aproximadamente 1100 y 3200 pb, coincidentes en tamaño para un miembro del género *Bromovirus*, aunque no se pudo establecer su asociación con el amachamiento debido a que ese patrón de bandas solo se presentó en el 55,5% de las muestras de plantas enfermas analizadas. Mediante la prueba de DAS-ELISA no se detectó el *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) en ninguna de las muestras de plantas con amachamiento analizadas lo que confirma que ese virus no es causante de la enfermedad. La aplicación de los postulados de Koch y la prueba de patogenicidad permitieron identificar al nematodo *Aphelenchoides besseyi* Christie como el agente causal del amachamiento; asimismo, descartar a otros organismos patógenos mencionados previamente como agentes causales del amachamiento (CCMV o fitoplasma).

Palabras claves: *Phaseolus vulgaris*, enfermedad emergente, falsa mancha angular, nematodo foliar.

ABSTRACT

***Aphelenchoides besseyi* Christie (Nematoda: Aphelenchoididae), causal agent of “amachamiento” of common bean**

Identification of the causal agent of the disease “amachamiento” of common bean was carried out using four tests: analysis of double strand RNA (dsRNA) of viral origin, DAS-ELISA technique, applying Koch’s postulates and the pathogenicity test. The analysis to detect dsRNA brought about two bands of approximately 1100 and 3200 bp, a similar pattern of bands for a member of genus *Bromovirus*. However, those bands were present only in 55.5% of the diseased plant samples analyzed; consequently, it was not possible to establish an association of a virus with the disease. The DAS-ELISA test did not detect *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) in any samples of diseased plants, confirming that the causal agent of the disease is not this virus. By using both Koch’s postulates and the pathogenicity test, the nematode *Aphelenchoides besseyi* Christie was identified as the real causal agent of the bean disease “amachamiento” and we were able to discard other pathogen organisms previously proposed as responsible for the disease (CCMV and phytoplasma).

Key words: *Phaseolus vulgaris*, emerging disease, false angular leaf spot, foliar nematode.

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un alimento básico en América Central y constituye la principal fuente de proteína vegetal, así como la de menor costo de que dispone la población (Salazar, 1999). En Costa Rica es consumido por más del 96% de la población (Rodríguez y Dumani, 2000; Dumani, 2001; Rodríguez, 2004) y actualmente alrededor de 6500 agricultores se dedican a su producción (J.C. Hernández, comunicación personal).

En Costa Rica los productores de frijol enfrentan problemas fitosanitarios que reducen el rendimiento del cultivo, entre los que destacan enfermedades causadas por *Phaeoisariopsis griseola* Sacc., Ferraris (mancha angular), *Thanatephorus cucumeris* Franc, Donk (mustia hilachosa), *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. et Mang., Scrib.

(antracnosis) (Araya y Hernández, 2006), *Aphelenchoides besseyi* Christie (falsa mancha angular) (Salas y Vargas, 1984; Barrantes et al., 2006) y el *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV; género *Bromovirus*; familia *Bromoviridae*) (Araya y Hernández, 2006).

El amachamiento del frijol es una enfermedad que se detectó por primera vez a inicios de los 90 en la región Brunca de Costa Rica (Morales et al., 1999) y en el norte de Panamá (E. Rodríguez, comunicación personal), y en 1999 ya se mencionó como una enfermedad problemática en la región Huetar Norte, zona fronteriza de Costa Rica con Nicaragua (Morales et al., 1999). Las plantas afectadas por esta enfermedad presentan coloración verde oscura, hojas coriáceas, guía anormalmente más larga y diversos grados de deformación foliar sin mostrar ningún tipo de mosaico o variegación (Morales et al., 1999; Araya y Hernández,

2006). El principal daño que provoca es la reducción significativa del número de vainas o su ausencia total, se han señalado pérdidas en productividad del 24 al 50% en variedades mejoradas, y superiores al 70% en las variedades Talamanca y Sacapobres bajo condiciones de invernadero (Morales et al., 1999).

En 1999, Morales y colaboradores recolectaron muestras de plantas con síntomas de amachamiento en las localidades de Veracruz y de El Águila de Pérez Zeledón, y Concepción de Buenos Aires (región Brunca), al sur del país. Por medio de análisis de microscopía electrónica, serológicos y de electroforesis de ácidos nucleicos virales, sugirieron que el bromovirus *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) era el agente causal de la enfermedad. Sin embargo, en contraposición a los resultados de esa investigación, Moreira et al. (2009) determinaron que el 57% de muestras de plantas con síntomas de amachamiento analizadas mediante DAS-ELISA para el CCMV y otros virus de frijol, resultaron negativas. Concluyeron en su trabajo que la enfermedad estaba asociada con la presencia de un fitoplasma. Por otro lado, en condiciones de campo se ha observado una alta asociación entre plantas con síntomas de amachamiento y de falsa mancha angular, enfermedad que ocasiona lesiones necróticas delimitadas por las nervaduras en las hojas del frijol (Barrantes, 2006).

Lo anterior hace evidente la incertidumbre en cuanto al verdadero agente causal del amachamiento del frijol. Por tal razón, el objetivo del presente trabajo fue identificar el agente causal del amachamiento del frijol y su relación con los síntomas observados en el campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de ARN de doble cadena (dsRNA)

Inicialmente y en forma exploratoria, se determinó la presencia de ARN de doble cadena en tejidos vegetales, un indicador de la presencia de virus con genoma de ARN, para lo que se realizaron dos muestreos. El primer muestreo se realizó de diciembre de 2008 a enero de 2009, y consistió en 15 muestras de trifolios de plantas individuales con síntomas de amachamiento y en estado de floración, provenientes de plantaciones comerciales ubicadas en las localidades de Veracruz (N 09°05'; O 83°32'; 657 msnm) y El Águila (N 09°07'; O 83°31' 491 msnm) del cantón de Pérez Zeledón, provincia de San José; y de Las Brisas (N 11°04'; O 85°36'; 351 msnm) y La Garita (N 11°06'; O 85°54'; 292 msnm) del cantón de La Cruz, provincia de Guanacaste. El segundo muestreo se realizó en julio del 2009 en la región Brunca y consistió en seis muestras compuestas de trifolios provenientes de diferentes plantas tomadas al azar: dos muestras de plantas sin síntomas visibles, una muestra de plantas con síntomas de falsa mancha angular y tres muestras de plantas con síntomas de amachamiento, provenientes de las localidades de Veracruz de Pérez Zeledón, y Pueblo Nuevo (N 09°07'; O 83°28'; 823 msnm) del cantón de Buenos Aires, provincia de Puntarenas.

Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional para ser liofilizadas. Posteriormente, fueron enviadas al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) en España para el análisis de dsRNA.

Para la extracción de dsRNA, se pulverizaron muestras de 0,9 g de tejido foliar en un mortero estéril con nitrógeno líquido y se siguió la metodología descrita por Morris y Dodds (1979) ligeramente modificada por Zabalgogezcoa y Gildow (1992). Una vez extraído, el dsRNA se guardó en una solución de 75% etanol por 24 h a -20°C. Posteriormente, se procedió a recolectar el dsRNA precipitado por centrifugación durante 20 min a 7000 rpm; el sobrenadante se decantó y se secaron los tubos con sedimento de dsRNA bajo una lámpara. Una vez secos, se procedió a disolver el dsRNA en 25-30 μ L de H₂O estéril y se trasvasó a un tubo Eppendorf, conservándolo en congelación hasta su uso para la electroforesis.

La electroforesis se corrió en un gel de agarosa al 1% (p/v) a 35-50 V durante 3-6 h en una solución de 0,04 M Tris (pH 7), 0,02 M de acetato de sodio y 0,001 M de EDTA. La tinción se hizo con bromuro de etidio y se visualizó el gel en un transiluminador con ayuda del software GeneSnap (Syngene).

Prueba de ELISA de doble anticuerpo tipo sandwich (DAS ELISA)

Para detectar la presencia del CCMV en muestras de tejido foliar provenientes de plantas de frijol con síntomas de amachamiento, en noviembre del 2009 se llevó a cabo la prueba de DAS-ELISA en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica. Se analizaron un total de 88 muestras y seis controles con anticuerpos específicos para la detección del CCMV (Neogen Europe Ltd - ADGEN Phytodiagnosics). Las muestras para la prueba de DAS ELISA fueron tomadas en seis localidades productoras de frijol en Costa Rica (Tabla 1); las muestras consistieron en trifolios jóvenes completamente expandidos de plantas individuales en etapa de desarrollo vegetativo (V3-V4), de las que se maceró 1 g de tejido en 10 mL de buffer general de extracción para correr la prueba de DAS ELISA.

Las muestras de plantas sanas – una muestra por repetición – expuestas a *Diabrotica balteata* Lec. y *D. adelpha* Harold provinieron de un ensayo previo realizado en la localidad de Veracruz de Pérez Zeledón (Chaves, 2011), donde se estudió la transmisión del amachamiento por insectos vectores, bajo la concepción de que esta enfermedad era de origen viral. Por su parte, las muestras de plantas inoculadas artificialmente con *A. besseyi* que desarrollaron síntomas de amachamiento fueron tomadas de la prueba de patogenicidad que se realizó como parte de esta investigación (una muestra por repetición).

La prueba de DAS-ELISA se realizó por duplicado y se utilizó un lector de placas (MRX Revelation, Dynex Magellan Biosciences) a una longitud de onda de 405 nm

TABLA 1 - Procedencia y tipo de muestra para la prueba de DAS-ELISA

Localidad	Tipo de muestra	Muestras analizadas
Veracruz, Pérez Zeledón	Planta sin síntomas	6
Pueblo Nuevo, Buenos Aires	Planta sin síntomas	2
Pueblo Nuevo, Upala (N 10°58'; O 85° 07'; 48 msnm)	Planta con síntomas de amachamiento	7
México, Upala (N 10°59'; O 85°03'; 47 msnm)	Planta con síntomas de amachamiento	7
Pueblo Nuevo, Buenos Aires	Planta con síntomas de amachamiento	14
Concepción, Buenos Aires	Planta con síntomas de amachamiento	14
Veracruz, Pérez Zeledón	Planta con síntomas de amachamiento	14
Veracruz, Pérez Zeledón	Planta sana expuesta durante 48h a adultos de <i>Diabrotica balteata</i> Lec. que previamente se alimentaron por 72 h de plantas con amachamiento	4
Veracruz, Pérez Zeledón	Planta sana expuesta durante 48 h a adultos de <i>D. adelpha</i> Harold que previamente se alimentaron por 72 h de plantas con amachamiento	4
EEAFBM*, Alajuela (N 10°01'; O 84°16'; 840 msnm)	Planta sana utilizada como testigo en la prueba de inoculación artificialmente con <i>A. besseyi</i>	4
EEAFBM, Alajuela	Planta inoculada artificialmente con <i>A. besseyi</i> que desarrolló síntomas de amachamiento	12
-	Control negativo	4
-	Control positivo	2

*EEAFBM: Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno.

para determinar la presencia del virus. Se consideraron estadísticamente positivas las muestras cuyo valor de absorbancia fue superior al valor del promedio para el control negativo más tres veces el valor de la desviación estándar (De Breuil et al., 2008; Maoka et al., 2010).

Postulados de Koch

Dado que en condiciones de campo se observó una asociación entre el amachamiento y la enfermedad conocida como falsa mancha angular, causada por *A. besseyi* (Barrantes, 2006), se aplicaron los postulados de Koch para determinar la patogenicidad de este nematodo: 1) determinar que existe una asociación constante entre el microorganismo y la enfermedad, 2) aislar el microorganismo, 3) inocular el microorganismo en un hospedante sano y reproducir los síntomas y 4) reaislar el mismo organismo del punto 2 (Agrios, 2005; Arauz, 2011).

El primer postulado se verificó en condiciones de campo, en plantaciones comerciales de frijol ubicadas en las regiones Brunca y Huetar Norte de Costa Rica, donde siempre se observó que las plantas con síntomas de falsa mancha angular también presentaban síntomas evidentes de amachamiento. Esta asociación ya había sido descrita por Barrantes (2006), pero a esa fecha se consideraban como enfermedades diferentes. Para cumplir con el segundo postulado, en junio del 2009 se recolectaron 250 g de folíolos con síntomas de falsa mancha angular y la misma cantidad con síntomas de amachamiento, los folíolos provenían de distintas plantas muestreadas en una plantación comercial de frijol en la localidad de Veracruz de Pérez Zeledón. El material recolectado fue analizado en el Laboratorio de

Nematología de la Universidad Nacional de Costa Rica, en Heredia, donde 2 g de tejido de cada muestra se colocaron dentro de un beaker de 50 mL con 10 mL de agua destilada durante 20 min, al cabo de los cuales se tomó una alícuota de 1 mL y se procedió a realizar un conteo de nematodos y su posterior identificación con ayuda de un microscopio de luz (Nikon Eclipse 80i) (Hoshino y Togashi, 1999; Barrantes, 2006). El resto de las muestras de follaje se utilizó para realizar la inoculación del nematodo y cumplir así con el tercer postulado.

La inoculación se efectuó en plantas sanas de frijol de la variedad Cabécar sembradas en potes plásticos en una casa de mallas en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno de la Universidad de Costa Rica, situada en San José de Alajuela (N 10° 01'; O 84°16'; 840 msnm); se llevó a cabo a partir de las 4 pm, en un día nublado de la época lluviosa, con temperatura entre 22-24°C y humedad relativa superior a 85%. Primero se humedecieron todas las plantas, luego de las muestras foliares con síntomas de falsa mancha angular, se recortaron trozos de tejido con lesiones (1 cm², aproximadamente 0,01 g) y se colocaron sobre las hojas cotiledonares y primera trifoliada en expansión a razón de un fragmento por foliolo. Se inocularon ocho plantas a los 15 días después de la siembra y cuatro adicionales se mantuvieron como testigos, luego todas las plantas fueron asperjadas con agua. Durante el ciclo de cultivo se observó el desarrollo de síntomas en las plantas y se mantuvieron condiciones de alta humedad para favorecer la infección (en los días que no hubo precipitación se procedió a asperjar las plantas con agua).

Para cumplir con el último postulado, de las plantas inoculadas se tomaron hojas con síntomas de falsa mancha

angular y amachamiento, y se colocaron en platos petri con 10 mL de agua destilada estéril. Luego de 20 minutos, se retiró el material vegetal y con ayuda de un estereoscopio (Olympus SZ61) se procedió a determinar la presencia de especímenes de *A. besseyi* en el agua.

Prueba de patogenicidad con el nematodo *A. besseyi*

Para confirmar la patogenicidad de *A. besseyi* y evaluar metodologías de inoculación se realizó un ensayo en casa de mallas en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno de julio a octubre del 2009. Para ello, se sembraron semillas de frijol sanas de la variedad Cabécar en pots plásticos de 1000 mL, cuyas plántulas fueron inoculadas con el nematodo a los 14 días después de la siembra según los tratamientos: testigo (aspersión con agua destilada), inoculación con una suspensión de nematodos (5 mL por plántula con una concentración de $21,2 \pm 3,6$ nematodos/mL), inoculación de cada hoja cotiledonal con un disco de tejido con lesiones de falsa mancha angular (1 cm de diámetro, aproximadamente 0,01 g y 530 nematodos/g) y la combinación de discos con suspensión.

Se empleó como fuente de inóculo foliolos con síntomas de falsa mancha angular provenientes de varias plantas muestreadas en una plantación comercial localizada en Veracruz de Pérez Zeledón, Costa Rica. La suspensión de nematodos se preparó con 20 g de foliolos que se depositaron en 500 mL de agua por espacio de 20 min, al cabo de los cuales se retiró el tejido vegetal (Hoshino y Togashi 1999; Barrantes, 2006). Posteriormente, se agitó la suspensión y se tomaron cinco alícuotas de 1 mL con las que se determinó la

concentración de nematodos en la suspensión para inocular. La inoculación se realizó a partir de las 4 pm, con 23°C y 85% de humedad relativa, y las plantas fueron humedecidas previamente para crear condiciones favorables al nematodo. Las plantas fueron observadas diariamente para determinar la presencia de síntomas y el período de incubación de la enfermedad. Durante la etapa de floración (R6) se evaluó la incidencia de falsa mancha angular y amachamiento, y al final del ciclo se cuantificó el número de vainas (verdes, totales y por planta) y la producción total por repetición (g).

Se establecieron cuatro repeticiones de doce plantas por tratamiento, a razón de cuatro plantas por pote plástico, en un diseño irrestricto al azar. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza de medias (ANDEVA) y la separación de medias por la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), con el software Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de dsRNA

En el análisis de dsRNA del primer muestreo se detectaron bandas de tamaño variable en las muestras analizadas (Figura 1), pero las más constantes fueron las de aproximadamente 1100 y 3200 pb, que aparecieron en el 66,7% de las plantas con síntomas de amachamiento. La banda de 3200 pb es similar a la encontrada por Morales et al. (1999), quienes indican que corresponde a un bromovirus que podría ser el CCMV. En términos de distribución geográfica, de la Figura 1 se infiere que esas bandas aparecieron en el

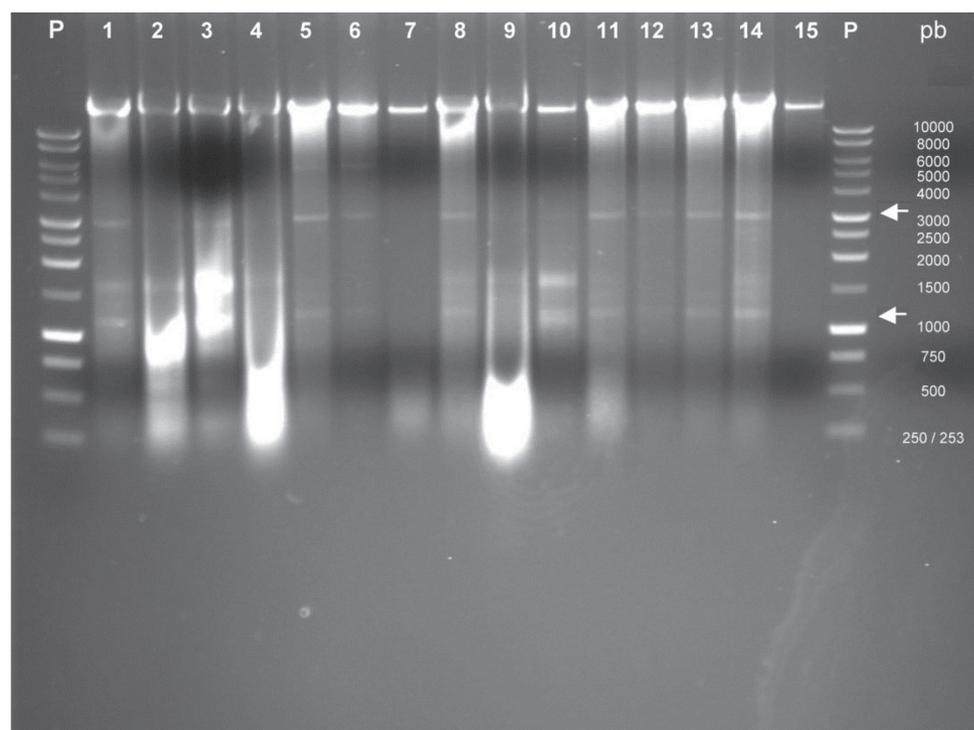


FIGURA 1 - Detección de ARN doble cadena en muestras de plantas de frijol con amachamiento. Líneas 1-4: muestras de Veracruz, Pérez Zeledón; Líneas 5-6: muestras de Las Brisas, La Cruz; Líneas 7-10: muestras de El Águila, Pérez Zeledón; Líneas 11-15: muestras de La Garita, La Cruz; Línea P: marcadores de peso molecular.

85,7% de las muestras provenientes de las comunidades de La Garita y Las Brisas de La Cruz, Guanacaste (región norte de Costa Rica); sin embargo, solo apareció en el 50% de las muestras provenientes de las localidades de Veracruz y El Águila de Pérez Zeledón, San José (región sur). En el segundo análisis de dsRNA, con muestras de plantas sin síntomas visibles y plantas enfermas, provenientes de las localidades de Veracruz de Pérez Zeledón y Pueblo Nuevo de Buenos Aires, no se detectó ninguna banda (Figura 2), lo que demuestra la ausencia de ARN de origen viral.

El CCMV, que pertenece al género *Bromovirus*, posee un genoma tripartito compuesto por tres ARN de 3171, 2774 y 2173 pb, respectivamente (Allison et al., 1989; Dziannott y Bujarski, 1991; De Assis et al., 2002). Además, del ARN 3 (2173 pb) se genera un RNA 4 subgenómico de aproximadamente 824 pb (Dasgupta y Kaesberg, 1982), que se transcribe y detecta en los análisis de ARN (Dinant et al., 1993; De Assis et al., 2002). A pesar de que el patrón de bandas obtenido en algunas muestras del análisis de dsRNA (Figura 1) podría ser compatible con un miembro del género *Bromovirus*, no es posible identificarlo a nivel de especie ya que de las bandas presentes, sólo la de 3200 pb corresponde con el tamaño de uno de los segmentos del genoma del CCMV. Además, la ausencia de dicha banda en varias de las muestras de plantas enfermas del primer grupo analizado (Figura 1) y su ausencia total en las muestras del segundo grupo (Figura 2), no permite relacionar al CCMV ni a otros virus de ARN con los síntomas de la enfermedad.

Los datos obtenidos en el análisis de dsRNA no confirmaron la presencia del CCMV y solo se observaron bandas en el 55,5% de las muestras provenientes de plantas

con síntomas de la enfermedad (Figuras 1 y 2), lo que no permite establecer una asociación sólida entre el virus propuesto por Morales et al. (1999) y los síntomas del amachamiento.

Prueba DAS-ELISA

Debido a que en pruebas preliminares (análisis de dsRNA) no se pudo determinar con claridad la presencia del CCMV ni su relación con la enfermedad, se analizaron 68 muestras de plantas con síntomas de amachamiento (Tabla 1) provenientes de cinco localidades de Costa Rica, por medio de la prueba de DAS-ELISA con anticuerpos específicos para la detección del CCMV.

El análisis serológico resultó negativo en todos los casos (Tablas 2 y 3), lo que confirmó la ausencia del CCMV en plantas de frijol con síntomas de amachamiento y permite descartar al CCMV como agente causal, en contraposición a lo indicado en las primeras investigaciones sobre esta enfermedad (Morales et al., 1999). Estos datos concuerdan parcialmente con los resultados obtenidos por Moreira et al. (2009), quienes determinaron que el 57% de las muestras de plantas con síntomas de amachamiento, analizadas mediante DAS-ELISA para el CCMV, resultaron negativas.

Por medio de la prueba de DAS-ELISA también se analizaron muestras de plantas sin síntomas de amachamiento (en estado V3-V4) que en estado de plántula habían sido expuestas 48 h a individuos de *Diabrotica balteata* y *D. adelpha*, que previamente se habían alimentado en plantas enfermas con amachamiento (Tabla 1). El análisis serológico de las muestras de plantas expuestas a crisomélidos indicó

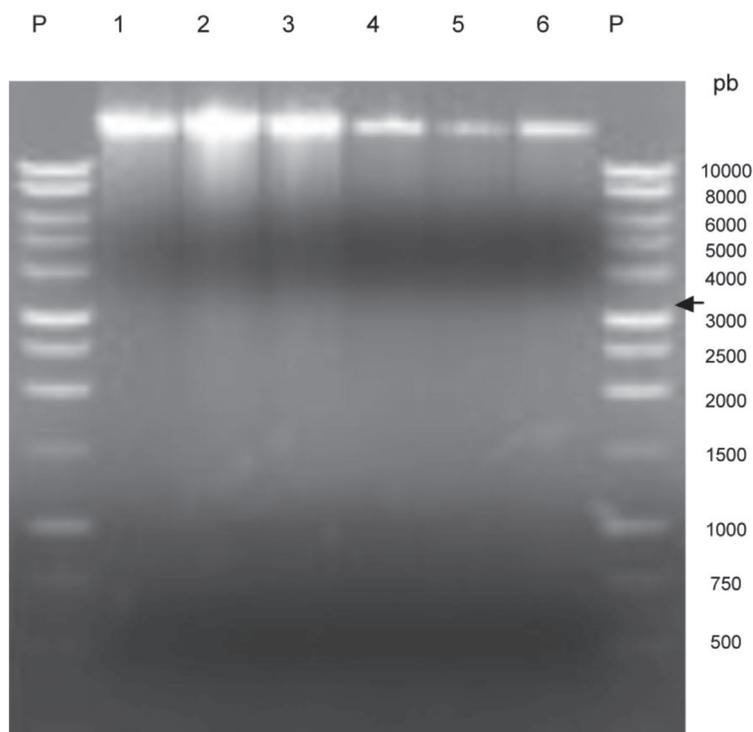


FIGURA 2 - Detección de ARN doble cadena en muestras compuestas de plantas de frijol. Línea 1: plantas sanas de Veracruz, Pérez Zeledón; Línea 2: plantas sanas de Pueblo Nuevo, Buenos Aires; Línea 3: plantas con infección por *A. besseyi* de Veracruz, Pérez Zeledón; Línea 4: plantas con amachamiento de Veracruz, Pérez Zeledón; Línea 5: plantas con amachamiento Pueblo Nuevo, Buenos Aires; Línea 6: plantas con amachamiento Pueblo Nuevo, Buenos Aires; Línea P: marcadores de peso molecular.

TABLA 2 - Resultados de absorbancia obtenidos en la prueba de DAS-ELISA (placa 1)

Muestra *	Pozo1	Pozo2	Prom.	Resultado	Muestra *	Pozo1	Pozo2	Prom.	Resultado
PNU 01	0,052	0,030	0,041	-	CBA 12	0,021	0,029	0,025	-
PNU 02	0,065	0,017	0,041	-	CBA 13	0,018	0,024	0,021	-
PNU 03	0,056	0,025	0,041	-	CBA 14	0,031	0,034	0,033	-
PNU 04	0,038	0,037	0,038	-	PNBA 01	0,032	0,058	0,045	-
PNU 05	0,064	0,023	0,044	-	PNBA 02	0,030	0,062	0,046	-
PNU 06	0,084	0,021	0,053	-	PNBA 03	0,034	0,038	0,036	-
PNU 07	0,057	0,040	0,049	-	PNBA 04	0,042	0,032	0,037	-
MXU 01	0,057	0,029	0,043	-	PNBA 05	0,034	0,034	0,034	-
MXU 02	0,033	0,027	0,030	-	PNBA 06	0,026	0,026	0,026	-
MXU 03	0,026	0,049	0,038	-	PNBA 07	0,042	0,041	0,042	-
MXU 04	0,036	0,012	0,024	-	PNBA 08	0,049	0,039	0,044	-
MXU 05	0,024	0,064	0,044	-	PNBA 09	0,063	0,045	0,054	-
MXU 06	0,029	0,032	0,031	-	PNBA 10	0,063	0,059	0,061	-
MXU 07	0,040	0,038	0,039	-	PNBA 11	0,040	0,020	0,030	-
CBA 01	0,031	0,042	0,037	-	PNBA 12	0,082	0,052	0,067	-
CBA 02	0,014	0,025	0,020	-	PNBA 13	0,029	0,039	0,034	-
CBA 03	0,010	0,022	0,016	-	PNBA 14	0,101	0,051	0,076	-
CBA 04	0,012	0,015	0,014	-	PNBA _s 01	0,104	0,072	0,088	-
CBA 05	0,018	0,016	0,017	-	PNBA _s 02	0,104	0,055	0,080	-
CBA 06	0,018	0,022	0,020	-	Control +	1,792	1,906	1,849	+
CBA 07	0,027	0,023	0,025	-	Control -	0,184	0,068	0,126	-
CBA 08	0,028	0,024	0,026	-	Control -	0,210	0,079	0,145	-
CBA 09	0,026	0,027	0,027	-	Prom. C-		0,135		-
CBA 10	0,027	0,036	0,032	-	sd C-		0,072		-
CBA 11	0,032	0,019	0,026	-	xC- + 3sd		0,352		-

*PNU: Pueblo Nuevo, Upala. Plantas con síntomas de amachamiento; MXU: México, Upala. Plantas con síntomas de amachamiento; CBA: Concepción, Buenos Aires. Plantas con síntomas de amachamiento; PNBA: Pueblo Nuevo, Buenos Aires. Plantas con síntomas de amachamiento; PNBA_s: Pueblo Nuevo, Buenos Aires. Plantas sin síntomas (control sano).

la ausencia del CCMV (Tabla 3), lo que sugiere que los individuos de *D. balteata* y *D. adelpha*, no eran infectivos, a pesar de que *D. balteata* es un conocido vector del CCMV (Gámez, 1976 y 1991; Morales et al., 1999; Šutic et al., 1999; Perry, 2001), de que los crisomélidos se alimentaron durante 72 h de plantas con síntomas de amachamiento y de que el virus se transmite por esta vía en frijol (Gámez, 1976; Hobbs y Fulton, 1979). Los resultados obtenidos sugieren que los crisomélidos nunca adquirieron virus alguno de las plantas con síntomas de amachamiento de las que se alimentaron.

Por otro lado, el análisis de DAS-ELISA de las muestras de plantas que desarrollaron síntomas de amachamiento a partir de la inoculación con *A. besseyi* resultó negativo para la presencia del CCMV (Tabla 3). La ausencia de reacción del anticuerpo específico en dichas muestras, en contraposición con los controles positivos empleados, evidencia nuevamente que la enfermedad no es causada por ese virus, como lo propusieron Morales et al. (1999).

Postulados de Koch

El primer postulado se cumplió plenamente en condiciones de campo, donde siempre se observó que tanto el amachamiento como la falsa mancha angular estaban

relacionados, ya que siempre que se presentaban los síntomas de una de las enfermedades en la planta, también se encontraron los síntomas de la otra. Lo observado confirmó la relación entre la falsa mancha angular y el amachamiento descrita por Barrantes (2006).

Con respecto a la asociación de los síntomas de la enfermedad con una posible infección vírica, los descritos por Hernández et al. (1999), Morales et al. (1999), y Araya y Hernández (2006) para el amachamiento en frijol (Figura 3) no coinciden con los descritos previamente para el BSYV, variante patogénica del CCMV en este cultivo (Fulton et al., 1975; Gámez, 1976; Blanco, 1978; Gámez, 1988 y 1991), ni con los síntomas ocasionados por el CCMV en otras leguminosas como caupí y soya, donde solo ocasiona moteados y mosaicos cloróticos en el follaje (Paguio et al., 1987; Šutic et al., 1999; De Assis et al., 2002). Así, en los primeros trabajos sobre el amachamiento no se logró establecer una relación clara entre los síntomas observados en campo con respecto a los indicados para el CCMV o sus variantes. Al respecto, Morales et al. (1999) indicaron que esa variación era debida a la adaptación del virus a diferentes condiciones ambientales o a las variedades de frijol de uso comercial en Costa Rica. Sin embargo, la inconsistencia en los síntomas observados se debe a que en realidad no hay un virus asociado, sino que son ocasionados por el nematodo

TABLA 3 - Resultados de absorbancia obtenidos en la prueba de DAS-ELISA (placa 2)

Muestra *	Pozo 1	Pozo 2	Prom.	Resultado	Muestra *	Pozo 1	Pozo 2	Prom.	Resultado
VPZs 01	0,041	0,031	0,036	-	VPZc 06	0,027	0,026	0,027	-
VPZs 02	0,065	0,027	0,046	-	VPZc 07	0,027	0,031	0,029	-
VPZs 03	0,040	0,028	0,034	-	VPZc 08	0,026	0,025	0,026	-
VPZs 04	0,037	0,025	0,031	-	FBAAt 01	0,027	0,028	0,028	-
VPZs 05	0,041	0,029	0,035	-	FBAAt 02	0,027	0,027	0,027	-
VPZs 06	0,040	0,029	0,035	-	FBAAt 03	0,028	0,028	0,028	-
VPZ 01	0,042	0,031	0,037	-	FBAAt 04	0,035	0,031	0,033	-
VPZ 02	0,035	0,027	0,031	-	FBAh 01	0,037	0,035	0,036	-
VPZ 03	0,033	0,027	0,030	-	FBAh 02	0,034	0,034	0,034	-
VPZ 04	0,036	0,028	0,032	-	FBAh 03	0,036	0,033	0,035	-
VPZ 05	0,036	0,026	0,031	-	FBAh 04	0,026	0,051	0,039	-
VPZ 06	0,033	0,028	0,031	-	FBAi 01	0,026	0,043	0,035	-
VPZ 07	0,036	0,027	0,032	-	FBAi 02	0,027	0,052	0,040	-
VPZ 08	0,036	0,027	0,032	-	FBAi 03	0,026	0,049	0,038	-
VPZ 09	0,035	0,028	0,032	-	FBAi 04	0,031	0,050	0,041	-
VPZ 10	0,028	0,025	0,027	-	FBAhi 01	0,041	0,037	0,039	-
VPZ 11	0,029	0,029	0,029	-	FBAhi 02	0,034	0,031	0,033	-
VPZ 12	0,027	0,026	0,027	-	FBAhi 03	0,033	0,034	0,034	-
VPZ 13	0,028	0,028	0,028	-	FBAhi 04	0,034	0,031	0,033	-
VPZ 14	0,028	0,027	0,028	-	Control +	1,530	1,222	1,376	+
VPZc 01	0,028	0,028	0,028	-	Control -	0,025	0,052	0,039	-
VPZc 02	0,028	0,028	0,028	-	Control -	0,054	0,025	0,040	-
VPZc 03	0,032	0,029	0,031	-	Prom. C-		0,039		-
VPZc 04	0,026	0,031	0,029	-	sd C-		0,016		-
VPZc 05	0,027	0,027	0,027	-	xC- + 3sd		0,088		-

*VPZs: Veracruz, Pérez Zeledón. Plantas sin síntomas (control sano); VPZ: Veracruz, Pérez Zeledón. Plantas con síntomas de amachamiento; VPZc: Veracruz, Pérez Zeledón. Plantas sanas expuestas a crismélidos; FBAAt: Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM), Alajuela. Plantas utilizadas como testigo en la prueba de inoculación con *A. besseyi*; FBAh: EEAFBM, Alajuela. Plantas con síntomas de amachamiento provenientes de la inoculación con discos de hoja con falsa mancha angular, FBAi: EEAFBM, Alajuela. Plantas con síntomas de amachamiento provenientes de la inoculación con suspensión de nematodos (*A. besseyi*); FBAhi: EEAFBM, Alajuela. Plantas con síntomas de amachamiento provenientes de la inoculación con discos de hoja con falsa mancha angular y suspensión de nematodos.



FIGURA 3 - Síntomas del amachamiento en el follaje de plantas de frijol en condiciones de campo.

A. besseyi, que típicamente causa lesiones necróticas y deformaciones en el follaje, como ha sido descrito para varios cultivos (Christie, 1982; Salas y Vargas, 1984; Nemeç, 1987; Escuer y Bello, 2000).

Para cumplir con el segundo postulado, se dejó en reposo en agua destilada estéril sendas muestras de tejido con los dos síntomas que caracterizan a la enfermedad: lesiones necróticas y deformación de folíolos. En ambas

muestras se logró determinar la presencia de especímenes de *A. besseyi*. De la suspensión proveniente de la muestra con lesiones necróticas se contó un total de 27 nematodos/mL, mientras que de la muestra con folíolos deformados 11 nematodos/mL. Al aislarse el mismo agente causal de tejidos con diferentes síntomas, se cumplió con el segundo postulado de Koch y se reforzó la idea de que se trata de un patógeno que causa dos tipos de síntomas en plantas de frijol.

Cinco días después de la inoculación (tercer postulado de Koch) y bajo condiciones de abundante precipitación, que favorecieron a *A. besseyi*, se empezaron a presentar pequeñas lesiones necróticas en las hojas cotiledonales de las plantas inoculadas, que luego crecieron y adquirieron la apariencia característica de los síntomas descritos para la enfermedad conocida como falsa mancha angular (Figura 4). Cuando las primeras hojas trifoliadas empezaron a expandirse, se deformó su nervadura central y la lámina foliar, mostrando los síntomas característicos descritos para el amachamiento (Figura 4). Por último, se observó aborto floral y la consecuente reducción en el número de vainas.

La prueba de inoculación con *A. besseyi* confirmó que se trata de una misma enfermedad que presenta dos síntomas muy diferentes. Inicialmente *A. besseyi* llega por salpique a hojas inferiores (Araya, 2008) y ahí se alimenta en forma ectoparasítica al insertar su estilete en las células de la epidermis, las que dañan para dar origen a las lesiones necróticas limitadas por las nervaduras foliares (Franc et al., 1996; Escuer y Bello, 2000; Agrios, 2005; Barrantes, 2006), síntoma conocido como falsa mancha angular. Luego, el nematodo asciende a las partes superiores de la planta a través de la película de agua que se forma sobre los tejidos cuando hay lluvias o alta humedad, como lo hace en arroz (Adamo et al., 1976), y se aloja en las yemas, donde daña

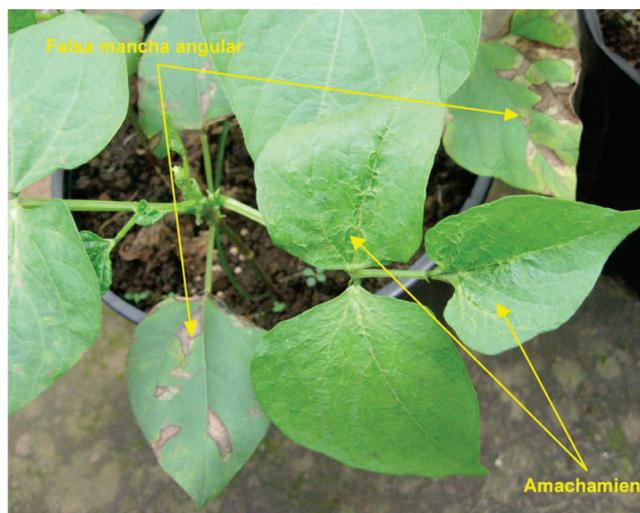


FIGURA 4 - Síntomas de amachamiento y falsa mancha angular ocasionados por *A. besseyi* en plantas de frijol inoculadas con este nematodo.

los primordios foliares y florales, lo que da como resultado la posterior deformación de las nervaduras, la lámina foliar y el aborto floral, que ocasiona ausencia de vainas, conjunto de síntomas que se conoce como amachamiento.

Contrario a las pruebas de inoculación con *A. besseyi* realizadas en este estudio, Morales et al. (1999) no pudieron reproducir fielmente los síntomas descritos para el amachamiento en sus pruebas de patogenicidad con el CCMV. A pesar de que obtuvieron deformación foliar en muchas de las variedades estudiadas, éstas también presentaron un moteado leve en algunos casos y clorosis en otros, por lo que los síntomas reproducidos no fueron coincidentes con lo indicado para el amachamiento, enfermedad que no ocasiona ni mosaicos ni variegaciones (Hernández et al., 1999; Morales et al., 1999; Araya y Hernández, 2006).

Para cumplir con el cuarto postulado de Koch, se logró recobrar especímenes de *A. besseyi* de las plantas inoculadas en el segundo postulado, tanto de hojas con lesiones necróticas como de aquellas con deformación. Con esto se comprobó que, efectivamente, el nematodo es el responsable de ambos síntomas observados en condiciones de campo, y que es el agente causal tanto del amachamiento como del síntoma necrótico descrito para la falsa mancha angular. Además, es importante resaltar que el cumplimiento de los postulados de Koch se llevó a cabo en Alajuela, localidad donde nunca se han registrado casos de amachamiento.

Prueba de patogenicidad con *A. besseyi*

En plantas de frijol sanas de la variedad Cabécar inoculadas con *A. besseyi* se reprodujeron los síntomas característicos del amachamiento, tanto cuando se inoculó el nematodo en suspensión como cuando se empleó tejido con síntomas de falsa mancha angular. Después de inoculadas las plantas, el nematodo demoró de cinco a 12 días en causar síntomas visibles (Tabla 4); inició con lesiones necróticas características y descritas como falsa mancha angular en las hojas cotiledonales, a partir de las cuales el patógeno ascendió hasta los puntos de crecimiento a través de la película de agua que se formó sobre los tejidos por las condiciones de humedad brindadas, al igual que fue determinado por Adamo et al. (1976) en arroz. Una vez en los puntos de crecimiento, el nematodo los dañó y produjo los síntomas característicos del amachamiento: deformación de la nervadura central y de la lámina foliar en las hojas trifoliadas expandidas. El período de incubación determinado en este ensayo (Tabla 4) fue menor al obtenido por Barrantes (2006) para la falsa mancha angular (12 a 16 días) en Heredia, una zona de menor temperatura promedio.

La notable y significativa reducción en el número de vainas, y por ende de la producción con respecto al testigo (Tabla 4), coincidió plenamente con lo observado en condiciones de campo, donde es común encontrar plantas con amachamiento con muy pocas vainas o su ausencia total (Hernández et al., 1999; Morales et al., 1999; Araya y Hernández 2006).

TABLA 4 - Periodo de incubación, incidencia de la enfermedad, número de vainas y producción total en plantas de frijol de la variedad Cabécar inoculadas con el nematodo *A. besseyi*

Tratamiento	Período de incubación (días)	Incidencia (%)		Vainas			Producción
		“falsa mancha”	amachamiento	verdes	totales	por planta	total (g)
Testigo	-	0,00 a	0,00 a	0,00 a	100,25 a	8,56 a	95,20 a
Suspensión	10 - 12 a	78,86 b	72,27 b	11,40 bc	69,00 b	6,35 b	68,00 b
Disco de hoja	5 - 8 b	100,00 c	100,00 c	15,75 c	40,50 c	3,45 c	36,89 c
Susp. + disco	5 - 8 b	100,00 c	100,00 c	7,25 b	33,75 c	2,87 c	31,23 c

*Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

La inoculación con discos de hoja o combinación de discos y suspensión presentó un menor período de incubación, mayor incidencia de la enfermedad, menor número de vainas y menor producción, que cuando se empleó solo la suspensión de nematodos (Tabla 4). Es probable que en el último caso parte de la suspensión escurriera y se redujera el inóculo que quedó sobre las hojas cotiledonales. Al respecto, Barrantes (2006) indica que en el daño causado por *A. besseyi* en frijol existe una alta influencia del inóculo primario.

Al igual que en condiciones de campo, en la prueba de patogenicidad las plantas inoculadas e infectadas por *A. besseyi* retardaron su senescencia con respecto a las plantas sanas. La reducción en el número de flores y de vainas por efecto del amachamiento, retrasó la senescencia natural de las plantas; consecuentemente, parte de las vainas producidas permanecieron sin madurar (Tabla 4), lo que incidió en una menor producción. El retraso en la senescencia se debió a la reducción de la competencia que se dió entre órganos reproductivos y vegetativos en la planta (Salisbury y Ross, 1994; Taiz y Zeiger, 2006), de manera que las sales minerales, azúcares y aminoácidos no se trasladaron a las vainas sino que permanecieron en el follaje, dándole la coloración verde oscura característica de las plantas afectadas por amachamiento. Resultados similares se obtuvieron con plantas de soya, cuando al eliminarles artificialmente sus flores retardaron su senescencia (Salisbury y Ross, 1994).

La prueba de patogenicidad y el cumplimiento de los postulados de Koch confirmaron que el nematodo *A. besseyi* es el verdadero agente causal del amachamiento y a su vez descartaron la posibilidad de que otros organismos estuvieran asociados con la enfermedad, como el fitoplasma propuesto por Moreira et al. (2009) o el CCMV indicado por Morales et al. (1999). En este último caso, dicha asociación no se pudo demostrar por medio de técnicas moleculares (dsRNA) y se descartó por medio de pruebas serológicas con anticuerpos altamente específicos (DAS-ELISA).

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación CRUSA, que por medio del convenio CRUSA-CSIC financió parcialmente el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- Adamo J, Madamba C, Chen T (1976) Vertical migration of the rice white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. Journal of Nematology 8:146-152.
- Agrios G (2005) Plant Pathology. 5th Ed. Amsterdam The Netherlands. Elsevier Academic Press.
- Allison R, Janda M, Ahlquist P (1989) Sequence of cowpea chlorotic mottle virus RNAs 2 and 3 and evidence of a recombination event during bromovirus evolution. Virology 172:321-330.
- Arauz L (2011) Fitopatología: un enfoque agroecológico. 2^{da} Ed. San José Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Araya C, Hernández J (2006) Guía para la identificación de las enfermedades del frijol más comunes en Costa Rica. San José Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG).
- Araya C (2008) Enfermedades y su combate. In Hernández J, Ramírez L (Eds.) Cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Manual de recomendaciones técnicas cultivo de frijol. San José Costa Rica. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). pp. 63-72.
- Barrantes W (2006) Epidemiología de la falsa mancha angular (*Aphelenchoides* spp.) en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica. San Pedro Costa Rica.
- Barrantes W, Araya C, Esquivel A (2006) Falsa mancha angular del frijol: una enfermedad que avanza en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 78:91-93.
- Blanco N (1978) El virus del moteado amarillo del frijol (BYSVc). Sus características y formas de transmisión en Cuba. Ciencias de la Agricultura 3:127-133.
- Chaves N (2011) Epidemiología del amachamiento y cuantificación de las pérdidas que ocasiona en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica. San Pedro Costa Rica.
- Christie J (1982) Nematodos de los vegetales: su ecología y control. México. Editorial Limusa.
- Dasgupta R, Kaesberg S (1982) Complete nucleotide sequence of the coat protein messenger RNAs of brome mosaic virus and cowpea chlorotic mottle virus. Nucleic Acids Research 10:703-713.
- De Assis F, Paguio O, Sherwood J, Deom C (2002) Symptom induction by Cowpea chlorotic mottle virus on *Vigna unguiculata* is determined by amino acid residue 151 in the coat protein.

Journal of General Virology 83:879-883.

De Breuil S, Nievas M, Giolitti F, Giorda L, Lenardon S (2008) Occurrence, prevalence, and distribution of viruses infecting peanut in Argentina. *Plant Disease* 92:1237-1240.

Dinant S, Janda M, Kroner P, Ahlquist P (1993) Bromovirus RNA replication and transcription require compatibility between polymerase- and helicase- like viral RNA synthesis proteins. *Journal of Virology* 67:7181-7189.

Dumani M (2001) Producción nacional de frijoles: su significado para la salud y el estado nutricional de la población costarricense. In Hernández J, Araya R (Eds.) V Taller Anual de Resultados de Investigación y Transferencia en Tecnología del PITTA-FRIJOL. Alajuela Costa Rica. Editoria de la Universidad de Costa Rica. pp. 13-16.

Dzianott A, Bujarski J (1991) The nucleotide sequence and genome organization of the RNA-1 segment in two bromoviruses: broad bean mottle virus and cowpea chlorotic mottle virus. *Virology* 185:553-562.

Escuer M, Bello A (2000) Nematodos del género *Aphelenchoides* de interés fitopatológico y su distribución en España. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* 26:47-63.

Franc G, Beaupré C, Gray F, Hall R (1996) Nematode angular leaf spot of dry bean in Wyoming. *Plant Disease* 80:476-477.

Fulton J, Gámez R, Scout H (1975) Cowpea chlorotic mottle and bean yellow stripple viruses. *Phytopathology* 65:741-742.

Gámez R (1976) Los virus del frijol en Centroamérica. IV. Algunas propiedades y transmisión por insectos crisomélidos del virus del moteado amarillo del frijol. *Turrialba* 26:160-166.

Gámez R (1988) Virus del moteado amarillo del frijol. In: Schwartz H, Gálvez G (Eds.) Problemas de producción de frijol. Cali Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). pp. 249-251.

Gámez R (1991) Bean yellow stipple. In: Hall R (Ed.) Compendium of bean diseases. St. Paul MN, EEUU. APS Press. pp. 47-48.

Hernández J, Morales A, Acosta M (1999) Evaluación del combate químico de vaquitas (Coleoptera: Chrysomelinae) vector del *virus del moteado clorótico del caupí* (CCMV) en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en la Región Brunca. In: Bertsch F, García J, Rivera G, Mojica F, Badilla W (Eds.) V Congreso Nacional de Entomología, Memorias.... Vol. II. San José Costa Rica. EUNED. pp.183.

Hobbs H, Fulton J (1979) Beetle transmission of cowpea chlorotic mottle virus. *Phytopathology* 69:255-256.

Hoshino S, Togashi K (1999) Effect of water-soaking and air-drying on survival of *Aphelenchoides besseyi* in *Oriza sativa* seeds. *Journal of Nematology* 32:303-308.

Maoka T, Sugiyama S, Maruta Y, Hataya T (2010) Application of cDNA microarray for simultaneous detection of 12 potato viruses. *Plant Disease* 94:1248-1254.

Morales F, Araya C, Hernández J, Arroyave J, Cuervo M, Velasco A, Castaño M (1999) Etiología del amachamiento del frijol común en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas* 52:42-48.

Moreira L, Villalobos W, Saborío G, Garita L, Castro S, Romero J, Ramírez P, Rivera C (2009) A phytoplasma associated with 'amachamiento' disease of dry common bean in Costa Rica. *New Disease Reports* 19. Disponible en: www.bspp.org.uk/publications/new-disease-reports/ndr.php?id=019031. Consultado: 20 de noviembre de 2009.

Morris T, Dodds J (1979) Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69:854-858.

Nemec S (1987) Nematode diseases. In: Maas JL (Ed.) Compendium of strawberry diseases. St. Paul MN, EEUU. APS Press. pp. 125.

Paguio O, Boerma H, Kuhn C (1987) Disease resistance, virus concentration, and agronomic performance of soybean infected with cowpea chlorotic mottle virus. *Phytopathology* 77:703-707.

Perry K (2001) Cucumoviruses. In: Harris K, Smith O, Duffus J (Eds.) Virus-insect-plant interactions. St. Paul MN, EEUU. Academic Press. pp. 167-180.

Rodríguez L, Dumani M (2000) Campaña educativa con respecto al consumo de frijoles. In Araya R (Ed.) IV Taller Anual de Resultados de Investigación y Transferencia en Tecnología del PITTA-FRIJOL, Memorias.... Alajuela Costa Rica. pp. 35-41.

Rodríguez L (2004) El proyecto "Campaña educativa para incrementar el consumo de frijoles". *Agronomía Mesoamericana* 15:245-261.

Salas L, Vargas E (1984) El nematodo foliar *Aphelenchoides besseyi* Christie (Nematodo: Aphelenchoididae) como causante de la falsa mancha angular del frijol en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 8:65-68.

Salazar J (1999) Situación actual y perspectivas de la producción de frijol en Costa Rica. In: III Taller Anual de Resultados de Investigación y Transferencia en Tecnología del PITTA-FRIJOL, Memorias... Alajuela Costa Rica. pp. 11-18.

Salisbury F, Ross C (1994) Fisiología vegetal. México. Grupo Editorial Iberoamérica.

Šutic D, Ford R, Tošic M (1999) Handbook of plant diseases. Boca Raton FL, EEUU. CRC Press.

Taiz L, Zeiger E (2006) Plant Physiology. 4th Ed. Sunderland MA, EEUU. Sinauer Associates Inc.

Zabalgoeazcoa I, Gildow F (1992) Double-stranded ribonucleic acid in "Barson" barley. *Plant Science* 83:187-194.

TPP 440 - Recibido 10 Noviembre 2011 - Aceptado 19 Enero 2013
Editor de Sección: Rosângela D'Arc L. Oliveira