USO DE LA PRUEBA DE ARN VIRAL DE DOBLE HEBRA (ARN-dh) EN LA DETECCIÓN DE VIRUS EN SEMILLAS DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)[1]

Use of double stranded RNA analysis (ds-RNA) in virus detection in bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.)

Paulina Sepúlveda R.[2] y Luis López M.[3]

SUMMARY

ds-RNA analysis was used to detect virus infection in Coscorrón-INIA bean seeds obtained from the field and greenhouse. The test was performed on pregerminated seeds (groups of 20, 30 and 40 seeds; field material) and different proportions of infected seeds (greenhouse material). ELISA test and symptomathology were used as control methodologies.

A characteristic banding pattern similar to that of the Potyvirus group was obtained from seeds from infected plants (field and greenhouse). As BCMV is the only Potyvirus that is seed transmitted in beans, it was assumed that bean seeds were infected with this virus.

The results were validated by ELISA test and symptomathology observed in the plants. Banding pattern was more frequently observed in samples containing 40 seeds than 30 or 20.
The present study establishes the possibility to use dsRNA analysis as a methodology for detecting virus in bean seeds.

Key words: virus, BCMV, virus detection, ds-RNA analysis, electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por virus constituyen uno de los factores más limitantes para la producción de fréjol en Chile, impidiendo que se exprese su real potencial de rendimiento, pese a las excelentes condiciones agroecológicas existentes en nuestro país (Alvarez *et al.*, 1981).

Si bien a nivel mundial se han determinado numerosos virus afectando al fréjol, en Chile sólo se han identificado cuatro: el Virus del Mosaico Común del Fréjol (Bean Common Mosaic Virus, BCMV), el Virus del Mosaico Amarillo del Fréjol (Bean Yellow Mosaic Virus, BYMV), el Virus del Mosaico del Pepino (Cucumber Mosaic Virus, CMV) y el Virus del Mosaico de la Alfalfa (Alfalfa Mosaic Virus, AMV) (Sepúlveda *et al.*, 1993). Todos producen síntomas similares en las hojas caracterizados por mosaico, moteado, deformación y acucharamiento en variada intensidad según sea el estado de desarrollo en el cual la planta es infectada por el virus. También se han observado síntomas en otras partes de la planta como vainas y tallo donde se producen deformaciones y necrosis, especialmente en el caso de la raza necrótica de BCMV y AMV (Sepúlveda *et al.*, 1993).

La transmisión de virus a través de la semilla juega un rol importante en la ecología y epidemiología de algunos virus. Según Mandahar (1981), de los cuatro virus presentes en Chile, sólo dos son transmitidos por semillas (BCMV y CMV); sin embargo, Kaiser y Hannan (1991), también señalan a AMV como posible de transmitirse en la semilla. En estudios preliminares realizados en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación La Platina, no se ha logrado comprobar la transmisión de AMV y CMV por semilla (trabajos no publicados, realizados por la primera autora).

Para la detección de virus en semilla se han utilizado varios métodos, algunos de ellos son demorosos tales como la inoculación a plantas indicadoras, la siembra de semillas y posterior visualización de sintomatología típica de virus, mientras otros permiten determinar virus en 24 a 48 horas. Entre

[1]Recepción de originales: 10 de julio de 1995.
[2]Centro Regional de Investigación La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.
[3]Servicio Agrícola y Ganadero, Km 22, Ruta 68, Santiago, Chile.

ellos se menciona la prueba ELISA (enzyme-linked inmunosorbent assay), (Clark y Adams, 1977), microscopía electrónica, etc.

La prueba de ARN-dh desarrollada por Morris y Dodds (1979), para el análisis de ácido ribonucleico de doble hebra desde plantas infectadas por virus y hongos, podría ser usada en la detección de virus en semilla. Esta técnica no específica, permite detectar mezclas de infecciones virales, situación que no es posible con el uso de los métodos tradicionales. Aunque la prueba de ARN-dh ha sido usada ampliamente en la detección de virus en diferentes materiales vegetales (Morris y Dodds, 1979; Morris *et al.*, 1983; Valverde *et al.*, 1990), sólo ha sido mencionada una vez como técnica para detectar virus en semilla (Sepúlveda, 1994).

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la factibilidad del uso de la prueba de ARN-dh en la detección de virus en semilla de fréjol, así como también determinar el mínimo número de semillas necesarias para detectar el virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica de ARN-dh se utilizó como metodología de diagnóstico en dos tipos semilla de fréjol variedad Coscorrón-INIA, una proveniente de una siembra severamente afectada por virus durante la temporada 1992-93, ubicada en el Centro Regional de Investigación (CRI) La Platina, Santiago (**material primario**), y otra proveniente de una mezcla conocida de semillas sanas y enfermas obtenida de una multiplicación realizada en invernadero bajo condiciones controladas (**material secundario**).

Para realizar el primer análisis se tomó una muestra de aproximadamente 1 kg de semilla (material primario) y se subdividió en grupos de 20, 30 y 40 semillas cada uno, con 12 repeticiones. Como control de la infección de virus en la semilla primaria, se evaluó el porcentaje de transmisión de virus por sintomatología visual. Para ello se sembraron 400 semillas de Coscorrón-INIA en maceteros con tierra esterilizada y se mantuvieron en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura (22-28 °C) y humedad (60-70%) y con protección de una malla fina para evitar la entrada de insectos vectores. Las evaluaciones se realizaron a los 20 y 30 días después de la siembra contando el número de plantas con síntomas de mosaico, moteado, etc. Luego se procedió a realizar la prueba de ELISA (indirecto) (Clark y Adams, 1977) en las plantas, utilizando antisuero para el grupo de los Potyvirus (AGDIA Inc.).

Una vez determinada la sanidad o no de las plantas (mediante sintomatología visual), éstas se conservaron hasta la cosecha de modo de obtener semillas provenientes de plantas sanas y enfermas.

La segunda prueba de ARN-dh se realizó a grupos de 40 semillas (con dos repeticiones) con diferente proporción de semilla proveniente de plantas sanas o enfermas según se señala a continuación:

1. 100% semilla proveniente de plantas enfermas.
2. 50% semilla proveniente de plantas enfermas + 50% semilla proveniente de plantas sanas.
3. 25% semilla proveniente de plantas enfermas + 75% semilla proveniente de plantas sanas.
4. 12,5% semilla proveniente de plantas enfermas + 87,5% semilla proveniente de plantas sanas.
5. 100% de semilla proveniente de plantas sanas.

Adicionalmente, como una forma de comparación con los datos obtenidos en la prueba de ARN-dh, se evaluó por sintomatología visual el porcentaje de transmisión por semilla para el material secundario. Para ello, se sembraron 50 semillas provenientes de plantas enfermas (sintomáticas) y se mantuvieron en invernadero bajo las mismas condiciones que para el material primario, así como también las evaluaciones realizadas fueron las mismas.

La aislación, purificación y análisis del ARN-dh se realizó de acuerdo al método descrito por Valverde *et al.* (1990), con algunas modificaciones que se señalan a continuación:

Preparación de la muestra

Las semillas se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos, luego se lavaron con agua estéril para sacar el exceso de hipoclorito de sodio y se hidrataron en agua estéril por 24 horas a temperatura ambiente. Luego se removió la testa de cada semilla y se procedió a separar la zona del embrión con un sacabocados de 5 mm de diámetro. Posteriormente, las porciones de semilla conteniendo el embrión (unidades embrionarias), se dejaron en cámara húmeda a 21 °C, con luz artificial durante 24 horas para inducir germinación.

Aislamiento del ácido nucleico

La extracción del ácido nucleico para cada grupo de semillas, se realizó a partir de las unidades embrionarias pregerminadas, las que se molieron en un mortero en presencia de amortiguador de extracción (equivalente a una proporción de 2,86 ml/g de tejido) STE (0,1 M NaCl, 50 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA, pH 6,8). El extracto se colectó en tubos de polialómero y se agregó 1 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS)

(10% p/v), 0,5 ml de bentonita (suspensión acuosa al 2% p/v) y 10 ml de fenol saturado con STE. La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. En seguida las muestras se centrifugaron a 8.000 x g durante 15 minutos a 6 °C. Posteriormente se separaron 10 ml de la fase acuosa (superior) y se agregaron 2,1 ml de etanol al 95%.

Purificación del ARN-dh

Para la purificación del ARN-dh se pesaron 2 porciones de 1 g cada una de celulosa (SIGMA, celulosa fibra media) por muestra y se resuspendió cada una en 25 ml de amortiguador STE que contenia 16% de etanol (STE-etanol).

Una de las porciones se centrifugó a 8.000 x g por 15 minutos descartándose el sobrenadante y luego se le adicionó la muestra (T° ambiente). La aislación y recolección de los ácidos nucleicos se realizó por medio de centrifugación en presencia primero de 20 ml de STE-etanol (dos veces) y luego con 6 ml de STE. El sobrenadante de la última centrifugación se recolectó en un tubo de polialómero y se le adicionó 2,1 ml de etanol al 95%. La otra porción de celulosa se preparó en jeringas de plástico de 50 ml, taponadas con lana de vidrio. La suspensión de celulosa se mezcló bien, colocándose en las columnas, se dejó eluir el exceso de STE-etanol. Los ácidos nucleicos de la muestra, obtenidos por centrifugación con la primera porción de celulosa, se adicionaron a las jeringas con celulosa, para luego lavarlas con 40 ml de STE-etanol; posteriormente se eluyó el ARN-dh con 6 ml de STE, separándolo así del resto de los ácidos nucleicos. El ARN-dh se concentró por precipitación con 20 ml de etanol 95% y 0,5 ml de acetato de sodio 3 M pH 5,5. La mezcla se incubó toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifugó a 8.000 x g durante 25 minutos a 6 °C. El precipitado se resuspendió en 100 ml de amortiguador muestra (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 5% SDS, 50% glicerol y 0,01% de azul de bromofenol).

Análisis electroforético del ARN-dh

Los ARN-dh se analizaron por electroforesis en geles verticales (160 x 140 x 1 mm) de poliacrilamida al 6% (30 : 0,8 = acrilamida : bisacrilamida), preparado en amortiguador de electroforesis (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 7,8). Las muestras (40 ml) corrieron por un período de 3 horas a 120 volts, 60 mA, en el amortiguador de electroforesis. Los geles se tiñeron con nitrato de plata (Iglio, 1983).

Como patrones electroforéticos conocidos fueron utilizados, BCMV (Potyvirus) de hojas de fréjol variedad Coscorrón-INIA infectado artificialmente con este virus; CMV (Cucumovirus) de hojas de *Nicotiana clevelandii* inoculadas artificialmente con este virus. Como control negativo se utilizó semillas sanas de fréjol variedad Tórtola-INIA, Como control cero se utilizó amortiguador de electroforesis.

Los resultados de la prueba fueron evaluados de acuerdo a la presencia de «bandas» y su «movilidad relativa» fue estimada de la siguiente manera:

Movilidad relativa = distancia recorrida / distancia total del gel.

En este caso la distancia total fue de 10 cm.

El tamaño molecular del ácido nucleico se estimó por comparación con los patrones conocidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ácido Ribonucleico Viral de doble hebra (ARN-dh)

Un ejemplo de los resultados obtenidos para esta prueba en el material primario se presenta en la Figura 1. En ella se observa (muestras 2, 3, 4, 6, 10 y 11) la presencia de una banda, que sugiere la presencia de virus, ya que no se presentó dicha banda en semilla sana como tampoco en el control cero (muestras 8 y 13 respectivamente). El patrón encontrado presenta similitud con el de los Potyvirus (una banda de tamaño molecular de 3,1 x 10^6 Da para el ARN de hebra simple) (Walkey, 1985), lo que concuerda con el marcador de masa molecular BCMV usado en esta prueba, que presentó una banda electroforética con una movilidad relativa de 0,04 y una masa molecular aproximada de 6,2 x 10^6 Da para el ARN-dh (muestra 9). El otro control utilizado (CMV) (muestra 7) presentó tres bandas intensamente teñidas, con una movilidad relativa de 0,09; 0,10 y 0,14 ; las cuales tienen un tamaño molecular de: CMV-1 = 2,3 x 10^6 Da, CMV-2 = 2,0 X 10^6 Da, CMV-3 = 1,4 x 10^6 Da (Dodds, 1993).

En el Cuadro 1, se presenta un resumen de los resultados obtenidos con los tres grupos de semillas (material primario). En él se destaca que a medida que se aumenta el número de semillas, aumenta la probabilidad de encontrar bandas correspondientes a virus. Así es el caso que, cuando el grupo está compuesto por 20 semillas, la frecuencia de detección es menor que cuando se aumenta en un 50% el número de semillas y más aun cuando se aumenta en un 100% la cantidad de material utilizado. Este aumento en el número de muestras positivas a virus a medida que se aumenta el número de semillas, es

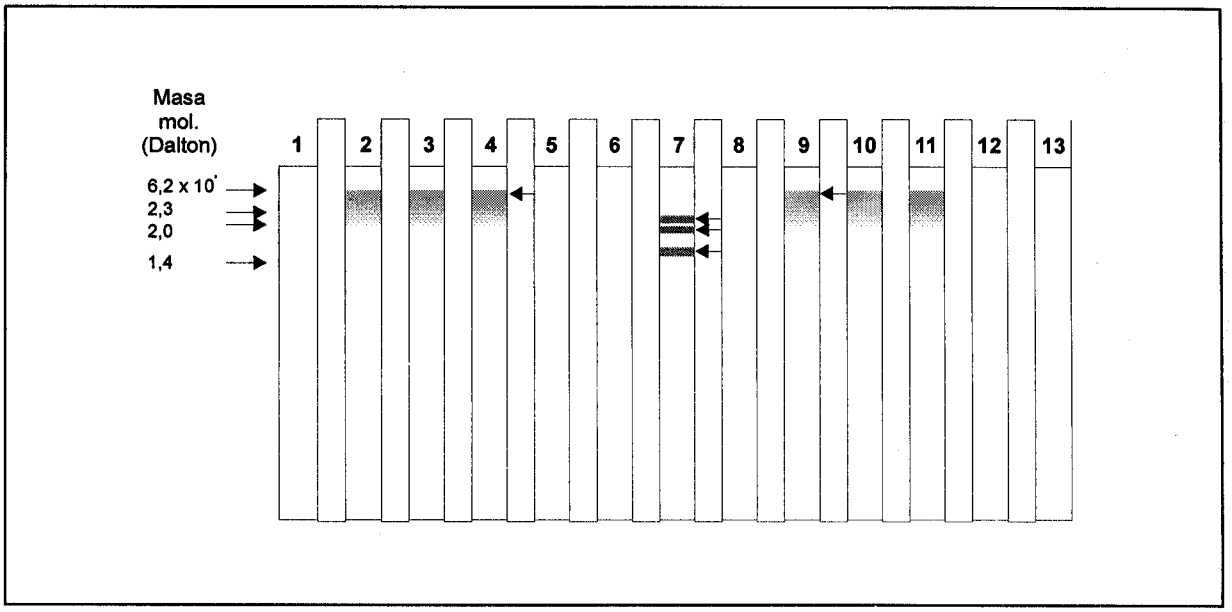

FIGURA 1. Separación electroforética de ARN-dh presente en semillas de fréjol Coscorrón-INIA, material primario.
Muestras: 1, 2 y 3: grupos de 20 semillas; 4, 5 y 6: grupos de 30 semillas; 7: hojas de *N. clevelandii* infectadas con CMV; 8: control libre de virus, fréjol Tórtola-INIA; 9: hojas de fréjol infectadas con BCMV; 10, 11 y 12: grupos de 40 semillas; 13: amortiguador de electroforesis. Electroforesis: gel de poliacrilamida 6%, teñido con nitrato de plata, 60 mA y 120 Volts por 3 horas.

FIGURE 1. Electrophoretic separation of dsRNA present in bean seeds Coscorrón-INIA (primary material).
Samples 1, 2, 3: groups of 20 seeds; 4, 5, 6: groups of 30 seeds; 7: positive control, *N. clevelandii* inoculated with CMV; 8: healthy bean Tórtola-INIA; 9: positive control BCMV infected leaves; 10, 11, 12: groups of 40 seeds; 13: electrophoresis buffer.
PAGE 6% silver stained, 60 mA and 120 volts for 3 hours.

CUADRO 1. Detección de virus mediante el uso de ARN-dh en grupos de 20, 30 y 40 semillas de fréjol Coscorrón-INIA (material primario)

TABLE 1. Virus detection by ds-RNA analysis in lots of 20, 30 and 40 bean seeds Coscorrón-INIA (primary material)

Número de semillas por muestra	Número de muestras positivas* /total de muestras
20	4/12
30	6/12
40	8/12

*Muestra positiva = presencia de banda electroforética.

explicado por Baker (1972), quien menciona que dentro de una misma planta infectada, las semillas pueden no ser portadoras de virus, por lo tanto al aumentar la cantidad de semilla analizadas, aumenta la probabilidad de detectar el virus.

Un ejemplo de los resultados obtenidos para las semillas del material secundario se presenta en la Figura 2. En ella se destaca que todos los tratamientos que contenían algún porcentaje de semilla enferma (100, 50, 25 y 12,5 %), presentaron una banda idéntica con una movilidad relativa de 0,04 y un tamaño molecular aproximado de 6,2 x 10^6 Da. Esta banda presentaba similitud con el patrón de BCMV utilizado en este estudio y que corresponde al de los Potyvirus descrito por Walkey (1985).

Los resultados obtenidos con ambos tipos de semilla (material primario o secundario), permitieron demostrar que la técnica utilizada es adecuada para detectar la presencia de virus en ellas. Todas las bandas encontradas en las muestras sometidas a esta prueba presentaban una estrecha similitud con el control positivo (BCMV), lo que permite asociar la infección de las semillas analizadas con BCMV. Además, de los cuatro virus citados por Sepúlveda *et al.* (1993), que están presentes en Chile en cultivos de fréjol, el BCMV es el único Potyvirus que se transmite por semilla. Por lo anteriormente expuesto, es posible presumir que las semillas estudiadas estaban infectadas en su embrión con BCMV lo que concordaría con lo mencionado por Baker (1972) en relación a la forma de transmisión de ese virus.

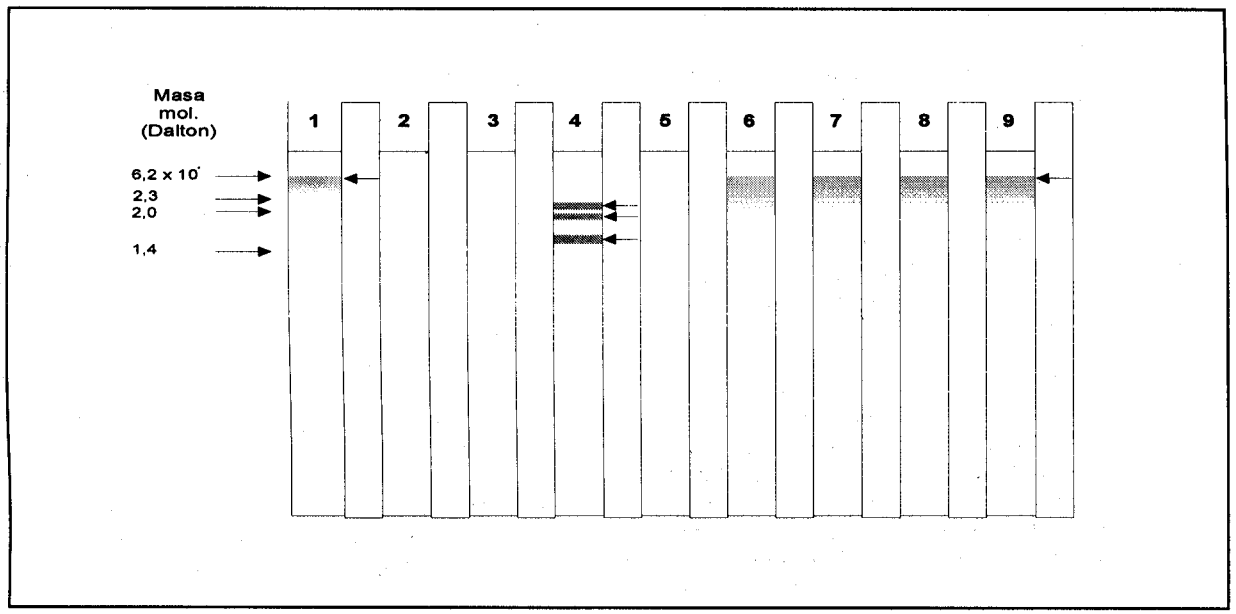

FIGURA 2. Separación electroforética de ARN-dh presente en grupos de semilla de fréjol Coscorrón-INIA con diferente proporción de infección, material secundario.
Muestras: 1: hojas de fréjol infectado con BCMV; 2: control libre de virus, hojas de fréjol Tórtola-INIA; 3: amortiguador de electroforesis; 4: hojas de *N. clevelandii* infectadas con CMV; 5: 100% de semilla proveniente de planta sana; 6: 12,5% de semilla proveniente de plantas enfermas; 7: 25% de semilla proveniente de plantas enfermas; 8: 50% de semilla proveniente de plantas enfermas; 9: 100% de semilla proveniente de plantas enfermas.
Electroforesis en geles de poliacrilamida 6%, 60mA y 120 Volts por 3 horas.

FIGURE 2. Electrophoretic separation of dsRNA in bean seeds Coscorrón-INIA (secondary material).
Samples 1: bean leaves infected with BCMV; 2: healthy bean Tórtola-INIA; 3: electrophoresis buffer; 4: *N. clevelandii* inoculated with CMV; 5: 100% bean seeds from healthy plants; 6: 12,5% bean seeds from infected plants; 25% bean seeds from infected plants; 50% bean seeds from infected plants; 100% bean seeds from infected plants.
PAGE 6% silver stained, 60 mA and 120 volts for 3 hours.

También, es importante mencionar que de las muestras que contenían 100 % de las semillas provenientes de plantas sanas (asintomáticas), el 50% de ellas no exhibió banda de virus, en cambio en el otro 50% se presentó una banda con una movilidad relativa de 0,04 y un tamaño molecular de 6,3 x 10^6 Da, idéntica a las bandas de las semillas provenientes de plantas enfermas. Esto estaría básicamente explicado, ya que el criterio de asignar sanidad a las plantas y por ende a la semilla, fue la presencia o ausencia de síntomas en la planta madre. La literatura menciona que no existe relación directa entre la manifestación de síntomas y la presencia del virus; es así como una planta puede no presentar síntomas y el virus si estar presente en ella, lo que se denomina «infección latente» (Walkey, 1985).

Considerando lo anteriormente señalado, con esta técnica se puede detectar la presencia de virus en semilla al igual que en otros tejidos vegetales como lo señalan varios autores (Bar-Joseph *et al.*, 1983; Dodds *et al.*, 1984; Gildow *et al.*, 1983; Mirkov *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 1979; Valverde *et al.*, 1990).

Prueba inmuno enzimática (ELISA)

Los resultados obtenidos en las pruebas de ELISA para Potyvirus (AGDIA, Inc.) realizadas a las plantas del material primario y secundario, permitieron comprobar la existencia de un Potyvirus, transmitido por semilla en fréjol, validándose con esto los resultados obtenidos en la prueba de ARN-dh para cada uno de los tipos de semilla.

Evaluación de transmisión por sintomatología

Los síntomas encontrados en las plantas (material primario y secundario) a los 20 y 30 días de emergencia correspondieron a mosaicos de área verde claro y oscuras y malformaciones de hojas (acucharamiento). Se encontró mayor expresión de síntomas a medida que transcurría el tiempo desde la siembra, llegando a 50% de plantas con virus (material primario) a los 30 días. Por otra parte, cuando la semilla se propagó por segunda vez (material secundario), el número de plantas que desarrolló síntomas disminuyó (20% a los 30 días). Esta reducción en la ex-

presión de los síntomas en el material secundario, posiblemente se deba a que en invernadero la infección de BCMV se llevó a cabo principalmente a través de polen infectado (Madahar, 1981); mientras que la infección del material primario en el campo se habría originado principalmente de la transmisión por áfidos.

En forma natural, la diseminación del virus por medio de áfidos es la principal vía de infección (Bos, 1971), pero en este ensayo controlado (multiplicación en invernadero), eso no fue posible, por lo cual se redujo el número de plantas infectadas en la progenie. Otra razón que justifica esta reducción en el número de plantas con síntomas se basa en que la temperatura en el invernadero varió entre 22 a 28 °C, mientras que las plantas del material primario se desarrollaron con temperaturas cercanas a 22 °C, las plantas del material secundario crecieron al borde del límite máximo (28 °C). Las temperaturas en los meses de enero y febrero (1994) en el invernadero fueron muy altas y habrían enmascarado los síntomas.

Según Jones (1993), la temperatura a la cual las plantas son cultivadas, puede tener un efecto significativo sobre la incidencia de transmisión de virus por semillas en algunas combinaciones virus/huésped, previniendo algunas veces la transmisión. A su vez, las altas temperaturas detienen la replicación del virus y también reducen los síntomas, particularmente en invernadero, cuando las temperaturas se mantienen constantes sobre 26 °C (Walkey, 1985).

La presencia de síntomas en las plantas del material primario y secundario, permitieron demostrar claramente la infección por virus de la semilla, que fue comprobado por la prueba de ARN-dh y ELISA.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación, permitieron concluir que:

- La prueba de ácido ribonucleico viral de doble hebra permitió detectar la infección por virus en semilla de fréjol variedad Coscorrón-INIA, tanto en material proveniente del campo como en una muestra de semillas con un porcentaje conocido de semilla enferma.

- A medida que se aumentó el número de semillas en la muestra, se aumentó la probabilidad de encontrar ARN-dh y por lo tanto, detectar infección viral.

- Veinte semillas fueron suficientes para detectar virus, sin embargo una muestra de 40 semillas permite tener una seguridad mayor de detección.

- De acuerdo a los resultados obtenidos de la prueba ARN-dh, ELISA y sintomatología visual en plantas de fréjol Coscorrón-INIA, se puede concluir que las semillas estaban infectadas con un Potyvirus, posiblemente BCMV.

RESUMEN

Se evaluó la factibilidad del uso de la prueba del ácido ribonucleico viral de doble hebra (ARN-dh) en la detección de virus en semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Coscorrón-INIA, provenientes de plantas cultivadas en el campo y en invernadero.

La prueba de ARN-dh se realizó en semillas pregerminadas (grupos de 20, 30 y 40 semillas, material de campo) como también en grupos de semilla infectada y sana en diferentes proporciones (material de invernadero). Como metodologías testigos se utilizaron la prueba de ELISA para el grupo Potyvirus realizada a plantas provenientes de semilla de campo e invernadero y la sintomatología presentada por las mismas.

Los resultados de la prueba de ARN-dh permitieron detectar la presencia de una banda característica para el grupo de los Potyvirus en las semilla de fréjol (campo e invernadero). Como BCMV es el único Potyvirus transmitido por semilla en fréjol, se asumió que las semillas estaban infectadas por este virus. Estos resultados fueron validados por las metodologías testigos utilizadas.

La facilidad de detección de virus fue mayor en muestras de 40 semillas que en 30 ó 20.

El presente estudio demostró la factibildad de uso de la prueba de ARN-dh, como una forma de detectar virus en semillas de fréjol.

Palabras claves: virus, detección, semilla, ARN-dh, electroforesis.

LITERATURA CITADA

ÁLVAREZ, M.; CAFATI, C.; GERDING, M.; GUIÑEZ, A.; LARRAÍN, P.; ORMEÑO, J.; SEPÚLVEDA, P. y TAPIA, F. 1981. Plagas y Enfermedades del Fréjol. Boletín Técnico 43, INIA, La Platina, Santiago Chile. 60 p.

BAKER, K.F. 1972. Seed Pathology, *In:* KOZLOWSKI, T.T. (Ed.) Seed Biology. Vol. II. Academic Press, USA. 447 p.

BAR-JOSEPH, M.; ROSNER, A.; MOSCOVITZ, M. and HULL, R. 1983. A simple procedure for the extraction of double-stranded RNA from virus-infected plants. Journal of Virological Methods 6: 1-8.

BOS, L. 1971. Bean Common Mosaic Virus. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses Nº 73. Surrey, England. 3 p.

CLARK, M.F. and ADAMS A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virology 34: 475-483.

DODDS, J.A., MORRIS, T.J. and JORDAN, R.L. 1984. Plant viral double-stranded RNA. Ann. Rev. Phytopatho-logy 22: 151-168.

DODDS, J.A. 1993. ds-RNA in diagnosis, in: MATTHEWS, R.E.F. Diagnosis of plant virus diseases. CRC Press Inc., USA. 374 p.

GILDOW, F.E.; BALLINGER, M.E. and ROCHOW, W.F. 1983. Identification of double-stranded RNAs associated with Barley Yellow Dwarf Virus infection of oats. Phytopathology 73: 1.570-1.572.

IGLIO, G.L. 1983. A silver stain method for detection of nanogram amounts of tRNA following two dimensional electrophoresis. Analytical Biochemistry 134: 184-188.

JONES, A.T. 1993. Experimental transmission of viruses, *In:* MATTHEWS, R.E.F. Diagnosis of plant viruses. CRC Press, USA. 374 p.

KAISER, W.S. and HANNAN, R.M. 1991. Alfalfa Mosaic Virus. *In:* HALL, R. (Ed.). Compendium of bean diseases. APS Press. USA. 73 p.

MANDAHAR, C.L. 1981. Virus transmission through seed and pollen, *In:* MARAMOROSCH, K. and HARRIS, K.F. (Eds.) Plant Diseases and Vector. Academic Press, USA. 241 p.

MIRKOV, T.E. and DODDS, J.A. 1985. Association of double-stranded ribonucleic acids with Lettuce Big Vein Disease. Phytopathology 75: 631-635.

MORRIS, T.J. and DODDS, J.A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. Phytopathology 69: 854-858.

MORRIS, T.J.; DODDS, J.A.; HILLMAN, B.; JORDAN, R.L.; LOMMEL, S.A. and TAMAKI, S.J. 1983. Viral specific ds-RNA: Diagnostic value for plant virus disease identification. Plant Molecular Biology Reporter 1: 27-30.

SEPÚLVEDA, P.; MENESES, L. y SOZA, P. 1993. Los virus en porotos. Investigación y Progreso Agropecuario La Platina (INIA). Santiago, Chile. 77: 26-27.

SEPÚLVEDA, R.P. 1994. Uso de la prueba de ARN viral de doble hebra en la detección de virus en semilla de haba. Fitopatología 29(1): 73-74. (Resumen).

VALVERDE, R.A.; NAMETH, S.T. and JORDAN, R.L. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Disease 74: 255-258.

WALKEY, D.G.A. 1985. Applied plant virology. Heinemann, London. 329 p.