

# Control químico de la transmisión del virus del mosaico del tabaco (*Nicotiana tabacum*) durante el manejo de plantas

José Ramírez Villapudua  
Roque A. Sáinz Rodríguez

Ramírez Villapudua, J. y Sáinz Rodríguez, R.A. 1994. Control químico de la transmisión del virus del mosaico del tabaco (*Nicotiana tabacum*) durante el manejo de plantas. Inter 3:5-12

## Resumen

Se determinó el efecto de diferentes sustancias sobre la transmisión mecánica del virus del mosaico del tabaco (VMT), durante el manejo de las plantas en el almácigo y el campo. En el invernadero se evaluó el efecto inhibitorio de la leche de vaca (cruda, hervida, pasteurizada, ultrapasteurizada y en polvo), suero de leche, Vanodine, detergente Ariel, jugo de limón mexicano, etanol 96%, hipoclorito de sodio (Cloralex) y agua sobre el VMT. Se usaron diferentes dosis y tiempos de exposición del inóculo del VMT con las sustancias antes mencionadas. El inóculo se preparó macerando 30 g de tejido foliar infectado con VMT en 10 ml de agua destilada esterilizada. Las dosis se prepararon diluyendo cada una de las sustancias en agua destilada esterilizada. El inóculo se mezcló, en proporción de 1: 1, con cada una de las dosis de las sustancias y luego se inoculó a hojas de *Nicotiana glutinosa*.

Los mejores resultados se obtuvieron con leche cruda, leche en Polvo, detergente y jugo de limón. La dosis del producto fue muy importante, mientras que el tiempo de exposición no fue significativo. Lo anterior indica que es suficiente sumergir las manos durante un breve tiempo en cualquiera de las sustancias efectivas para inactivar las partículas del VMT y de esta manera impedir su transmisión mecánica.

La leche hervida y la leche industrializada (pasteurizada, ultrapasteurizada, en polvo y condensada), fueron menos efectivas que la leche cruda. La leche hervida perdió casi totalmente la propiedad de inactivar el VMT, mientras

que la leche industrializada conservó en gran medida esta propiedad, indicando que la parte proteica de la leche es la responsable de la inactivación del VMT, la cual se desnaturaliza de acuerdo a la temperatura y tiempo de exposición durante el proceso de industrialización o ebullición de la leche.

En el campo, las manos se frotaron con plantas de tabaco afectadas con VMT e inmediatamente se sumergieron en leche cruda de vaca, jugo de limón mexicano, detergente Ariel (1:10), etanol 96% o agua destilada; luego, se arrancaron las plántulas del almácigo. El proceso anterior se repitió para trasplantar las plántulas en el campo. El testigo no infectado consistió en arrancar y trasplantar sin antes haber tocado plantas con VMT. Se obtuvieron resultados sobresalientes con leche cruda, detergente y jugo de limón, lo cual indica que estas sustancias son útiles para la prevención de la transmisión del VMT durante el manejo de plántulas de tabaco, aunque haya plántulas enfermas de VMT en el almácigo.

## Introducción

El cultivo del tabaco tiene gran importancia económica y social, por la mano de obra que emplea y el valor económico que genera. En el estado de Nayarit se cosechan aproximadamente 57 700 toneladas de tabaco rubio en una superficie de 33 000 hectáreas. Sin embargo, los rendimientos son seriamente afectados por el virus del mosaico de tabaco. 22

El mosaico del tabaco causa severas pérdidas en tabaco, tomate y chile, principalmente. Los síntomas más

comunes, en el tabaco, es la presencia de áreas verde oscuro y verde claras en las hojas (figura 1). Las áreas verdes son más pequeñas y aparecen, algunas veces, más elevadas que las áreas verde claro. El achaparramiento es muy común cuando la infección ocurre en estado de plántula (figura 2). Así, las plantas inoculadas al momento del trasplante o un mes después pueden reducir su rendimiento de un 33 a 20%, mientras que la calidad del cultivo puede reducirse de 5 a más de 25 %, dependiendo de la edad de la planta y de las condiciones ambientales.



Figura 1. Hoja de tabaco (*Nicotiana tabacum*) afectada por el virus del mosaico. Nótese las áreas verde oscuro y áreas verde claro.

Las primeras plantas enfermas provienen de semilla infectada y posteriormente el virus se transmite fácilmente en forma mecánica en el campo y en el invernadero, a través del manejo de las plantas. Esta enfermedad no es transmitida por insectos vectores, pero puede darse de manera accidental. [1, 16]

En tabaco (*Nicotiana tabacum*, Fig. 1), tomate y chile el VMT produce síntomas sistémicos; sin embargo, el tabaco *Nicotiana glutinosa* reacciona a la infección por VMT formando lesiones foliares necróticas (Fig. 3), las cuales permiten hacer cuantificaciones de las partículas del



VMT.

Figura 2. Plantas de tabaco afectadas por el virus del mosaico del tabaco. Nótese el achaparramiento de las plantas de la izquierda.



Figura 3. El tabaco, *Nicotiana glutinosa*, reacciona a la infección del virus del mosaico del tabaco formando lesiones locales.

Pocas publicaciones reportan el uso práctico de los inhibidores para prevenir la transmisión mecánica de las enfermedades

virales. Los inhibidores de infección no son específicos 15 y se han encontrado en extractos de plantas superiores, bacterias, insectos y líquenes 3. El efecto de estos inhibidores generalmente se ensaya comparando el efecto de una mezcla de virus-inhibidor con una concentración igual de virus sola. Se prueba una serie de concentraciones por el método de la «mitad de hoja».

La leche y sus componentes han sido estudiados intensivamente como posibles inhibidores. En experimentos de invernadero, se tuvo éxito en prevenir o reducir la transmisión por contacto del VMT con plantas de chile, tomate y tabaco que fueron asperjadas con leche antes de la inoculación; 10 la aspersión después de la inoculación dio poco control. El surfactante sodio dioctil sulfosuccinato, el cual aparentemente destruye la infectividad, es tan efectivo como la leche para reducir la dispersión del mosaico del tabaco en plantas de tomate, pero también retrasa el desarrollo y la floración. 7 Las aspersiones protectoras de leche también son efectivas en contra del virus del mosaico de la caña en plantas de caña; y las aspersiones de leche y suero protegen las plantas de cebada de la infección por el virus del mosaico rayado.

Se encontraron que el número más grande de lesiones por VMT en hojas de tabaco se produce en pH 6.7. Se notó significativa reducción en número de lesiones en pH 8, Y casi todas las lesiones se eliminaron arriba de pH 10. Con el ácido acético se observó reducción a pH 4.4 Y hubo pocas lesiones a pH 3.,1. Cuando las mezclas en alto o bajo pH se diluyeron después del tratamiento no hubo recuperación del virus. Presumiblemente, el virus había sido destruido. Por el contrario, la leche inactivó el VMT casi completamente a pH 6.7 y sustancialmente todos los virus se recuperaron en la forma activa diluyendo la mezcla leche-virus. 11

Muchos detergentes comerciales que contenían  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  evitaron la transmisión del VMT por semilla de tomate y fueron tan efectivos como el  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  solo. La semilla de plantas infectadas extraídas por fermentación y tratadas con  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  rindió 2 plántulas infectadas de un total de 1,910 semillas sembradas, en contraste con 70 plantas infectadas de un número similar de plántulas de semillas no tratadas. No se encontraron plantas infectadas en 900 plántulas de semillas extraídas con HCl, mientras que sí se encontraron 27 plantas infectadas entre 900 plántulas de semilla fermentada. 2

Los extractos acuosos de arroz rindieron uno o más inhibidores que previnieron la infección de varias plantas susceptibles por 12 a 15 virus probados. Los datos sugieren que la acción inhibitoria es una respuesta del hospedante más bien que respuesta del virus. 13

Por lo anterior, se probó el efecto de diferentes sustancias sobre la inhibición de la transmisión mecánica del virus del mosaico del tabaco: a) comparándose el efecto de una mezcla de virus-inhibidor con otra sin inhibidor e inoculándose mecánicamente en hojas de *Nicotiana glutinosa*; y b) frotándose las manos con plantas de tabaco infectadas por VMT e inmediatamente sumergiéndolas en diferentes sustancias.

## Materiales y métodos

### *Fase de invernadero*

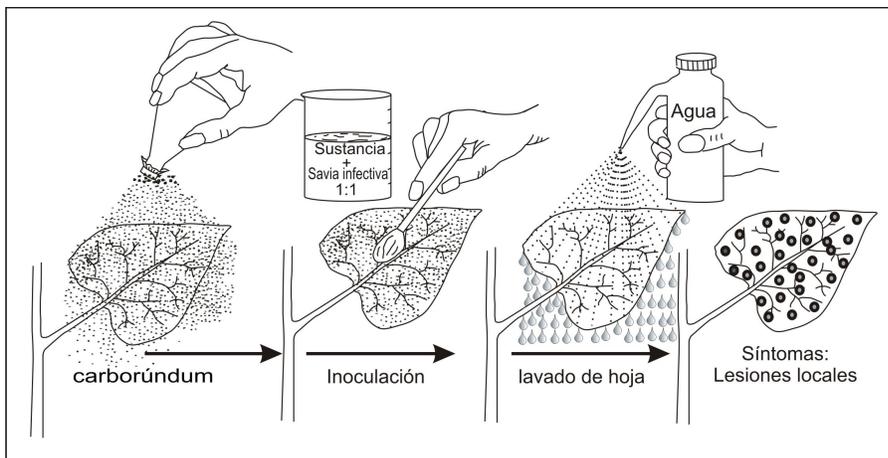
Esta etapa consistió en hacer inoculaciones de una mezcla de savia infectiva (proveniente de plantas de tabaco infectadas con VMT) y una sustancia química a hojas de *Nicotiana glutinosa*, la cual reacciona a la infección por VMT formando lesiones foliares necróticas. 11 Este tipo de reacción facilitó la evaluación cuantitativa del grado de inactivación de las partículas del VMT, de acuerdo con el número de lesiones locales por área foliar,

después de cada uno de los tratamientos.

El inóculo del VMT (savia infectiva) se preparó macerando, en un mortero 30 gramos de hojas de tabaco (*N. tabacum* cv *Virginia* 12) con síntomas de mosaico, más 10 ml de agua destilada. El extracto se exprimió con manta de cielo para extraer el jugo (savia infectiva) y eliminar los sólidos.

Las dosis se prepararon diluyendo cada una de las sustancias en agua destilada esterilizada, en proporción de 1:1, 1:10 Y 1:100. La savia infectiva se mezcló en proporción de 1:1 con cada una de las dosis de cada sustancia y después de 10 segundos, 1, 2, y 4 minutos de haberse preparado la mezcla se hicieron las inoculaciones a hojas de *Nicotiana glutinosa*. Las sustancias que se probaron fueron: 1) leche cruda de vaca, 2) etanol 96%, 3) jugo de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), 4) detergente Ariel®, 5) hipoclorito de sodio 5.25% (Cloralex®), 6) yodo elemental 2.5% (Vanodine®) y 7) agua destilada esterilizada.

Las hojas de *N. glutinosa* se espolvorearon con carborúndum (600 mallas) y enseguida se frotaron suavemente con un aplicador de algodón, el cual se había sumergido en cada una de las mezclas anteriores (figura 4). Las plantas se dejaron en invernadero a temperatura de 24-30°C y las lesiones foliares se contaron de 5 a 7 días después



de la inoculación.

El porcentaje de inhibición se determinó de la siguiente manera: % inhibición = 100 - [media del número de lesiones obtenidas con la mezcla «savia-sustancia»] (100)/ media del número de lesiones foliares obtenidas con la mezcla «savia infectiva-agua destilada».

#### Fase de campo

Con el fin de corroborar la eficacia de las sustancias que fueron más efectivas en la fase de invernadero, se llevó a cabo un experimento en el campo en un lote en donde nunca se había plantado tabaco ni tomate, para evitar infecciones de VMT provenientes del suelo. Se usó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones y cada parcela experimental tuvo cinco surcos de 15 metros de longitud con una separación de 70 cm. En cada surco se trasplantaron 3 2 plantas de tabaco cv *Virginia* 12, haciendo un total de 160 plantas por parcela experimental.

Los tratamientos se llevaron a cabo frotando las manos en plantas de tabaco cv *Virginia* 12, afectadas con VMT e inmediatamente después sumergiéndolas en leche cruda de vaca, etanol 96%, jugo de limón mexicano, detergente Ariel (1: 10) o agua destilada (testigo enfermo). Enseguida se procedió a arrancar las plántulas del almácigo. El proceso anterior

se repitió para trasplantar las plantas en el campo. Otro tratamiento, el cual sirvió como testigo sano, consistió en tocar las plántulas de tabaco sin haber tocado plantas enfermas. Después de 45 días del trasplante, se contó el número de plantas enfermas

localizadas en los tres surcos centrales de

cada una de las parcelas.

Inmediatamente después de esta evaluación, con una navaja de campo se cortaron las inflorescencias. Primeramente se cortó una planta con VMT, enseguida se sumergió la navaja en una de las sustancias antes mencionadas y luego se cortaron las inflorescencias de las plantas de tabaco. El cultivo se fertilizó con 200 kg de urea por hectárea y cada 15 días, después de 30 días del trasplante se aplicó Decis (400 ml/ha) y Manzate 200 (3 kg/ha) para controlar plagas y enfermedades fungosas, respectivamente.

## Resultados y discusión

### Efecto de diversas sustancias sobre la inactivación del VMT

Cuando se evaluó el efecto inhibitorio de las diferentes sustancias sobre las partículas virales del mosaico del tabaco (savia infectiva), por medio de la técnica de lesiones locales en hojas de *N. glutinosa*, se encontró que el detergente Ariel, hipoclorito de sodio, leche cruda de vaca, Vanodine y jugo de limón mexicano dieron un 99.9, 99.5, 98.9, 98.7 y 95.4% de inhibición de lesiones locales, respectivamente, cuando se usaron en proporción de 1:1 (Figura 5). El alcohol inhibió solamente el 18.7% de las lesiones, comportándose casi igual que el agua (testigo).

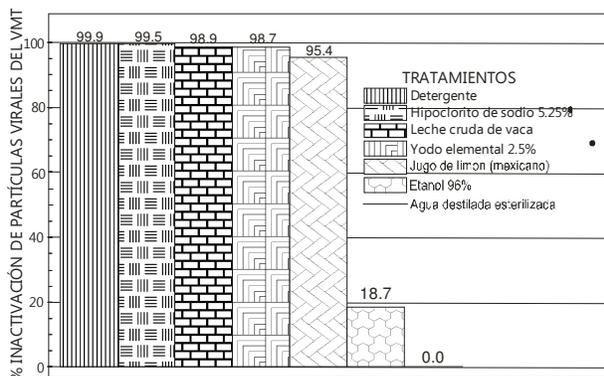


Figura 5. Efecto de diferentes sustancias sobre la inactivación de las partículas virales del virus del

mosaico del tabaco.

Los ensayos de infectividad se limitan a cuantificar solamente las partículas virales que están biológicamente activas y no dan indicación del número total de partículas virales presentes en la preparación; sin embargo, fueron de mucha utilidad para determinar la efectividad inhibitoria de las sustancias probadas, ya que el grado de infectivo de los tratamientos reflejó una concentración relativa de virus.

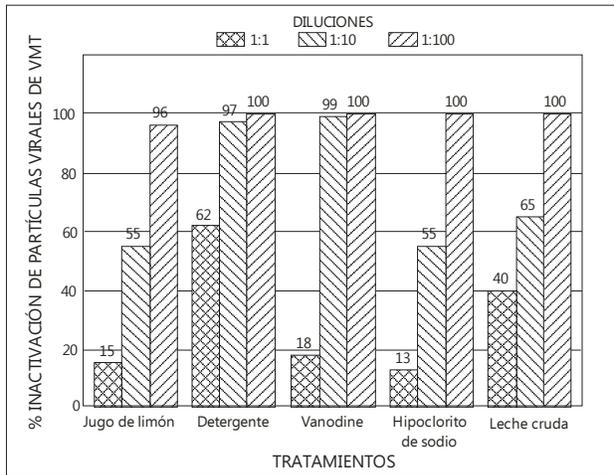
El alcohol tradicionalmente se usa en los invernaderos para desinfectar las manos y así impedir la transmisión del VMT durante el manejo de las plántulas; sin embargo, estos resultados muestran que no es efectivo para dichos propósitos, por lo que se debe sustituir por detergente, leche o jugo de limón.

El hipoclorito de sodio y el Vanodine en las concentraciones que fueron efectivas como inhibidores del VMT, no son recomendables ya que su uso requiere de enjuagar las manos y pudieran ser peligrosos para la salud de los trabajadores, siendo imprácticos, o más caros que las otras sustancias. Además, el hipoclorito de sodio fue fitotóxico a las concentraciones usadas. La leche cruda requiere de ciertos cuidados para que no se coagule, por lo que la mejor opción, para trabajar en el campo, puede ser el detergente (1:10), debido a su efectividad, fácil manejo y bajo costo. El tema de las sustancias inhibitoras ha sido revisado extensivamente por varios investigadores.

### Efecto de la dosis y tiempo de exposición de diferentes sustancias sobre el VMT

El porcentaje de inhibición de las lesiones locales en hojas de *N. glutinosa*, causadas por el VMT, fue directamente proporcional a la concentración de las sustancias inhibitoras

Figura 6. Efecto de la dosis de diferentes sustancias sobre el virus del mosaico del tabaco en hojas de *Nicotiana glutinosa*, medido en porciento de lesiones locales.



(Figura 6). Los tratamientos más concentrados fueron más efectivos para evitar la infección por el VMT que los tratamientos más diluidos. Se encontró un coeficiente de correlación de 0.99, 0.94, 0.91, 0.90 Y 0.88 entre el porcentaje de inhibición de las lesiones locales y las dosis de Vanodine, leche cruda, hipoclorito de sodio, jugo de limón y detergente, respectivamente.

El porcentaje de inhibición de lesiones foliares no se incrementó con el tiempo de la exposición del inóculo en las sustancias inhibitoras probadas. Se obtuvieron los mismos resultados con tiempo" de exposición de 10 segundos y 5 minutos, lo cual demuestra que el efecto inhibitorio de las sustancias sobre el virus es instantáneo. De estos resultados se desprende que las manos se pueden enjuagar directamente en estas sustancias para desinfectar las de partículas de VMT.

#### *Efectividad de la leche cruda y la industrializada sobre el VMT*

Cuando se investigó el efecto inhibitorio de la leche industrializada (pasteurizada, ultrapasteurizada, condensada y en polvo) en comparación con la leche cruda, se encontró que todos los tipos de leche

fueron inhibitorios para el VMT; sin embargo, la leche industrializada fue ligeramente menos efectiva que la leche cruda. Por ejemplo, con leche cruda, leche ultrapasteurizada, leche en polvo y leche pasteurizada hubo una reducción de 98.9, 95.6, 94.5 y 93.8% de las lesiones foliares, mientras que con leche condensada la reducción fue solamente de 65% (figura 7).

Es probable que la menor efectividad de la leche industrializada se deba al proceso de calentamiento para obtener el producto elaborado. La leche en polvo, por su fácil manejo, se puede preparar para usarse cuando sea necesario, sin correr el riesgo de que se descomponga. Es posible que para impedir la transmisión mecánica del VMT, durante el manejo de las plántulas en el almácigo y al momento del trasplante en el campo, sea suficiente hacer una aspersión de leche cruda o industrializada en el almácigo inmediatamente antes de arrancar las plántulas. Lo mismo es válido para el detergente.

#### *Componente de la leche con propiedades inhibitorias para el VMT*

Con el fin de conocer los componentes de la leche con propiedades inhibitorias para las partículas del VMT, se evaluó la leche hervida, suero crudo y suero hervido, los cuales se compararon con leche cruda de vaca y agua, usando concentraciones de 1:1 (savia infectiva:inhibidor). Mediante el uso de la leche cruda se evitó la formación de lesiones locales en las hojas de *N. glutinosa*, mientras que con el suero, leche hervida y suero hervido la inhibición de lesiones foliares fue de 40, 21 Y 14%, respectivamente, comparado con el tratamiento de agua destilada esterilizada (figura 8). Estos resultados demuestran que los inhibidores del VMT se encuentran en la leche cruda y mínimamente en el suero y que al hervir la leche se pierde gran parte del efecto inhibitorio.

### *Mecanismos de inhibición de la infección*

En la leche y el suero es probable que los inhibidores más importantes hayan sido las proteínas, lo cual confirmaría los resultados obtenidos por otros investigadores, quienes determinaron que el suero de conejo, la caseína y la fracción proteica de la leche de bovino (lactoglobulina) fueron las responsables de la inactivación de las partículas del VMT. Se ha postulado que las propiedades inhibitorias de estas sustancias se deben a la agregación de las partículas virales, de este modo disminuyendo el número de partículas libres (20), las cuales son las que participan en la conversión de un sitio infectible a un centro infectivo. Las proteínas de extractos de clavel, se cree que actúan compitiendo por los sitios receptores al inicio del proceso de infección.

La mayoría de los virus de los vegetales poseen puntos isoeléctricos en sustancias ácidas, y el inóculo con valores de pH cerca de tales puntos isoeléctricos puede causar que las partículas virales se precipiten o formen agregados. Tal pudiera ser el caso para el jugo de limón y el hipoclorito de sodio. El virus del mosaico del tabaco tiene un punto isoeléctrico cerca de pH 4.5 (14).

### *Control de la transmisión del VMF en el campo*

En el experimento de campo se confirmaron los resultados obtenidos en el invernadero en plantas de *N. glutinosa*. Los resultados más sobresalientes se obtuvieron con leche cruda de vaca, detergente Ariel y jugo de limón mexicano. La incidencia de la enfermedad fue nula cuando las manos contaminadas con VMT se sumergieron en leche bronca, se redujo drásticamente con jugo de limón o detergente y prácticamente no hubo ninguna reducción de la incidencia de la enfermedad cuando las manos contaminadas con el virus se sumergieron

en etanol 96%, en comparación con el agua (figura 9).

La incidencia de la enfermedad fue de 0.0, 1.0, 2.0, 2.0, 10.0 Y 11.0% con leche cruda, testigo no infectado (sin tocar plantas enfermas), detergente Ariel, jugo de limón mexicano, etanol 96% y agua, respectivamente. En el experimento de campo se simuló el manejo de las plantas en el arranque, transporte y trasplante en el campo, como ordinariamente se lleva a cabo por los agricultores en el estado de Nayarit.

La presencia de plantas enfermas (1 %) en el testigo no infectado es probable que se deba a la transmisión del VMT por semilla o a la contaminación durante el manejo de las plántulas de tabaco, al momento de arrancadas del plantero (almácigo) y/o durante las labores de cultivo. La marcada reducción de la incidencia del mosaico del tabaco mediante el uso de leche bronca, detergente y jugo de limón, indica que estas sustancias son útiles para la prevención de la transmisión del VMT durante el manejo de las plántulas de tabaco, aunque haya plántulas enfermas de VMT en el almácigo.

La leche en polvo es una buena alternativa práctica de control, ya que se puede preparar cuando se necesite; sin embargo, el detergente es más económico y fácil de manejar en el campo, plantero o invernadero. Es posible que asperjando la leche o detergente sobre las plántulas en el almácigo, inmediatamente antes de arrancarlas y posteriormente sumergiendo las manos en estas sustancias antes del trasplante se pueda evitar la transmisión del VMT durante el manejo de las plantas de tabaco, tomate o chile; sin embargo, en Nayarit no se arrancan plántulas de tabaco humedecidas debido a que se disminuye el prendimiento de éstas en el campo; después del trasplante.

Estos resultados, con algunas reservas, podrían aplicarse a otras enfermedades virales que se transmiten fácilmente y principalmente en forma mecánica, ya que se reporta que los inhibidores de infección no son específicos porque la misma sustancia puede inactivar virus muy diferentes, ejerciendo su acción cuando se aplican al tejido de la hoja antes o al mismo tiempo de la inoculación con el virus y tienen poco o nada de efecto cuando se mezclan poco después de la inoculación.

#### Literatura citada

- 1 Agrios, G.N. (1978). *Plant pathology*, second edition. Academic Press, New York. 703 pp.
- 2 Alexander, L.J. (1960). Inactivation of TMV from Tomato seed, *Phytopathology (abstracts)* 50: 627.
- 3 Bartels, W. (1955). Der gegenwartige stand der forschung auf dem gabiet der inaktivierung pflanzenpathogenviren, insbesondere des tabakmosaikvirus. *Phytopathol., Z.* 24:117-178.
- 4 Bawden, F.C. (1954). Inhibitors and plant viruses. *Advances in Virus Res.*, 2:51-57.
- 5 Bawden, F.C. (1964). *Plant virus diseases*, fourth ed., Ronald Press Company, New York, 361 pp.
- 6 Benda, G.T.A. (1956). The effect of New Zealand spinach juice on the infection of cowpeas by tobacco ringspot virus, *Virology*, 2:438-454.
- 7 Denby, L. G., and Wilks, J. M. (1963). The effect of tobacco mosaic on the yield of field tomatoes as influenced by sprays of milk and DOSS, *Can. J Plant Sci.*, 43: 457-461.
- 8 Duggar, B.M., and Armstrong, J.K. (1925). The effect of treating the virus of tobacco mosaic with juices of various plants, *Ann Missouri Botan Garden*, 12:359-366.
- 9 Gupta, B.M., and Price, W.C. (1950). Production of plant virus inhibitors by fungi, *Phytopathology*, 60:642-652.
- 10 Hare, W.W., and Lucas, G.B. (1959). Control of contact transmission of tobacco mosaic virus with milk, *Plant Disease Reporter*, 43:152-154.
- 11 Hare, W.W., and Lucas, G.B. (1960). Some effects of pH and milk on tobacco mosaic virus, *Phytopathology*, 50:638.
- 12 Kado, C. I., (1972). Mechanical and biological inoculation principles, in *Principles and techniques in plant virology*, C. I. Kado and Han U. Agrawal, Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- 13 Kahn, R.P., Allen, T.E. and Zaumeyer, W.J. (1960). Characteristics of plant virus inhibitors in rice, *Oryza sativa*, *Phytopathology*, 50:847-851.
- 14 Kassanis, B., and Kleczkowski, A. (1965). Mutual precipitation of two viruses, *Nature*, 205-310.
- 15 Loebenstein, G. (1972). Inhibition, interference and acquired resistance during infection, in *Principles and techniques in plant virology*, e. 1. Kado and Hari O. Agrawal, Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- 16 Lucas, G.B., and Hare, W.W. (1959). The inhibition of tobacco mosaic virus by proteins from bovine milk and blood serum, *Phytopathology*, 49:544.
- 17 Lucas, G.B., and Wiggs, D.N. (1963). Relative inhibitory power of juices from various plants on tobacco mosaic virus, *Phytopathology*, 53:624-626.
- 18 Ragetti, H. W. (1957). Behavior and nature of a virus inhibitor occurring in *Dianthus caryophyllus* L. *Tijdschr. Plantenziekten*, 63:254-344.
- 19 Ragetti, H. W. J., and Weintraub, M. (1962). Purification and characteristics of a virus inhibitor from *Dianthus caryophyllus* L. 1. Purification and activity, *Virology*, 18: 232-240.
- 20 Santilli, V., Piacitelli, J., and Wu, I. H. (1961). The effect of tobacco mosaic virus protein on virus incubation period and infectivity, *virology*, 14: 109-123.
- 21 Siegel, A., and Zaitlin, M. (1964). Infection process in plant virus diseases, *Ann. Rev. Phytopath.*, 179-202.
- 22 Tabacos Mexicanos, *Primer seminario de intercambio de conocimientos sobre el cultivo del tabaco*, Tepic, Nayarit, marzo de 1985.
- 23 Zaitlin, M., and Siegel, A. (1963). A virus inhibitor from tobacco, *Phytopathology*, 53:224-227.