

Etiología de la necrosis severa del tabaco¹

Enrique Peñaloza²

Olga Escaffi³

Bernardo Latorre³

INTRODUCCION

Se han descrito más de 16 virosis en tabaco en el mundo, de las cuales se destacan en importancia económica el mosaico (TMV), el virus Y de la papa o "vein banding" (PVY), el mosaico severo (TEV), la mancha anular (TRSV) y el mosaico del pepino (CMV). En Chile solamente se ha descrito la presencia de TMV (Mujica, 1961). No obstante, durante los últimos 5 ó 6 años se ha agudizado la incidencia de una nueva virosis que ha afectado severamente a las plantaciones de tabaco en el país, principalmente aquéllas ubicadas en el Valle de Aconcagua, V Región.

Los síntomas de esta nueva enfermedad se caracterizan por la presencia de manchas foliares necróticas, circulares, de aproximadamente 3—4 mm de diámetro, clareamiento de venas secundarias y terciarias, visibles particularmente en las hojas nuevas, moteado

clorótico intervenal, bandeado de venas secundarias y terciarias, mosaico y encarrujamiento foliar, deformación con "acucharamiento" de las hojas, necrosis de la nervadura central y de las venas secundarias y terciarias, así como en los internudos basales del tallo de las plantas enfermas y con el tiempo se extiende hacia la médula y haces vasculares. Finalmente, se produce un severo enanismo y, en algunos casos, la muerte de las plantas enfermas (Figura 1A). Atendiendo a las características sintomatológicas y a la magnitud de los daños observados, esta enfermedad se denominó "necrosis severa" del tabaco.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en los estudios realizados con el objetivo de determinar la naturaleza etiológica de esta enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Fuente de inóculo. Se utilizó como fuente de inóculo, plantas de tabaco Virginia cv. Coker 86, enfermas, colectadas en San Felipe, en enero de 1979.

Preparación y mantención del inóculo. Todas las determinaciones se realizaron con extracto de plantas enfermas, obtenido por maceración de hojas en solución tampón fosfato de potasio 0,05M, pH 7,0, conteniendo 0,01M de dietil-ditiocarbamato de sodio (DIECA) (2 ml de solución tampón por gramo de hojas enfermas). El inóculo se mantuvo en tabaco Virginia cv. Coker 86, bajo condiciones de invernadero, durante el desarrollo de la investigación.

¹ Recepción de originales: 2 de julio de 1981.

Parte de la tesis presentada por el autor principal a la Facultad de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales, U. de Chile, para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Los autores agradecen a los Drs. G. Apablaza y G.V. Gooding Jr., Pontificia Universidad Católica de Chile y North Carolina State University, respectivamente, por la colaboración prestada en este trabajo y por haber proporcionado los antisueños necesarios.

² Ing. Agr., Estación Experimental Carillanca (INIA), Casilla 58—D, Temuco, Chile.

³ Ing. Agr. e Ing. Agr., Ph.D., respectivamente, Facultad de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales, U. de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile.

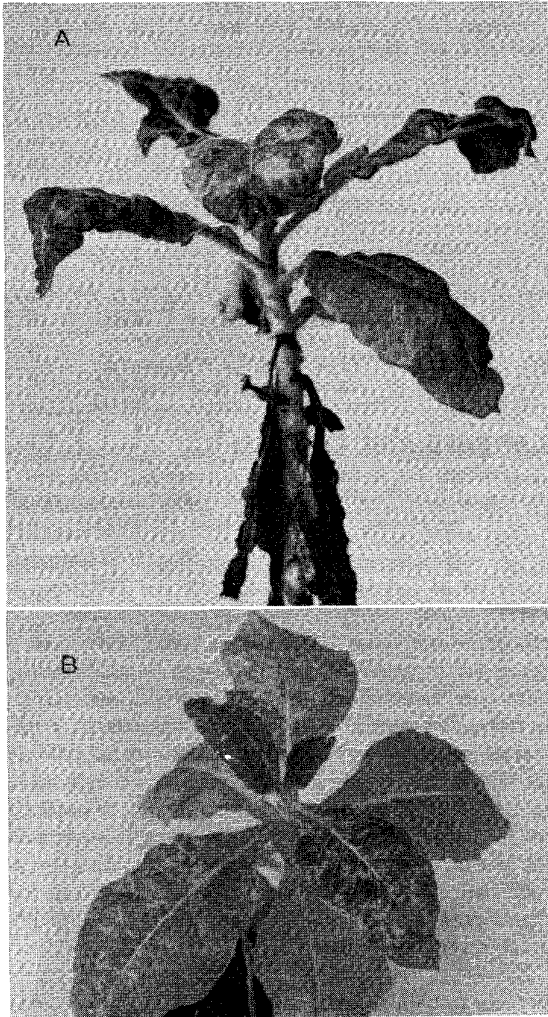


Figura 1. Síntomas de la "necrosis severa" del tabaco. A. Síntomas observados a campo en tabaco Virginia cv. Coker 86 (fuente de inóculo); B. Síntomas reproducidos en tabaco Virginia cv. Coker 86 mediante inoculación por áfidos.

Rango de hospederos. Con el propósito de establecer la respuesta sintomatológica de diversas plantas herbáceas, se inocularon mecánicamente las siguientes especies: *Nicotiana tabacum* cv. Coker 86, 347, Burley 21 y White Burley; *N. glutinosa*; *Cucumis sativus* cv. National Pickling; *C. melo* cv. Honey Dew, Hales Best y Printed Dow; *Cucurbita pepo*; *Chenopodium amaranticolor*; *Datura stramonium*; *Phaseolus vulgaris* cv. Apolo; *Solanum demissum* x *S. tuberosum* (Híbrido A-6); *Vigna sinensis* cv. Black Eye y *Gomphrena globosa*.

Propiedades físicas. Se determinó el punto de inactivación termal (PIT) y el punto de dilución final

(PDF), mediante inoculación mecánica del extracto viral sobre plantas de *Ch. amaranticolor*. También se determinó el PIT y el PDF del virus separado en *C. sativus* cv. National Pickling, desde plantas de tabaco Virginia cv. Coker 86, infectadas mediante áfidos. La inoculación mecánica de este extracto viral se realizó sobre plantas de *V. sinensis*.

El PIT se estableció a partir de extracto viral tratado térmicamente durante 10 min, a 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 y 90° C, de acuerdo con la metodología detallada por Fernández-Valiela (1969). Una vez que el extracto alcanzó la temperatura deseada, se mantuvo por 10 min y luego se enfrió rápidamente hasta 20° C, antes de inocular 10 plantas indicadoras por cada tratamiento térmico. Como testigos positivos se utilizaron 10 plantas inoculadas con extracto viral sin tratar. El PDF se determinó mediante dilución del extracto viral en proporciones de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸. Cada dilución se utilizó para inocular 10 plantas indicadoras. Como testigos positivos se dejaron 10 plantas inoculadas con extracto viral sin diluir.

Microscopía electrónica. Las observaciones al microscopio electrónico se efectuaron a partir de preparaciones realizadas en 2 formas: a) por inmersión de una grilla de cobre, malla 300 y cubierta con una fina membrana de colodión, en extracto de plantas enfermas y, posteriormente, teñida en fosfotungstato de potasio al 2 por ciento (Hitchborn y Hill, 1965) y b) por el método histopatológico, para lo cual pequeños trozos de hojas enfermas, de 2 x 5 mm, se fijaron en glutaraldehído al 2 por ciento durante 2 hr a 20° C; se postfijaron en tetróxido de osmio al 2 por ciento por 18 hr a 20° C y, posteriormente, se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (10, 30, 50, 70, 95 y 100 por ciento v/v). Los trozos se mantuvieron por 10 min en cada dilución. Finalmente, se embebieron lentamente en resina epóxida, de acuerdo con Spurr (1969). Cortes ultrafinos se obtuvieron en un ultramicrotomo SORVALL MT-2B, provisto de cuchillo de diamante. Los cortes se recogieron en grillas de cobre malla 300, se tñieron en acetato de uranilo al 2 por ciento por 30 min y, luego, en acetato de plomo al 0,25 por ciento durante 2 min (Mercer y Birbeck, 1972).

Todas las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico Philips EM-300.

Transmisión por áfidos. La transmisión de la enfermedad por áfidos se realizó con adultos ápteros de la especie *Myzus persicae*. Los insectos se mantuvieron 2 hr en ayuno y, posteriormente, se colocaron por 10–20 seg en hojas de tabaco Virginia cv. Coker 86, enfermas. Inmediatamente después se transfirieron a 8 plantas de tabaco Virginia Coker 86, sanas, en las cua-

les se mantuvieron por 30 min (10 áfidos/planta). Posteriormente los áfidos se retiraron manualmente, ayudado por un pincel.

Purificación. La purificación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Govier y Kassanis, citados por Govier y Plumbs (1972). Con este propósito, aproximadamente 100 g de hojas de tabaco enfermas se cosecharon y se homogenizaron en una licuadora, con tetra acetato etileno diamina (EDTA) 0,1M, pH 7,6, conteniendo 0,01M de DIECA (2 ml de EDTA—DIECA por gramo de tejido enfermo). El extracto resultante se filtró a través de una gasa y se clarificó por centrifugación a 15.000 G por 30 min. El sobrenadante se dializó por 24 hr en 10 volúmenes de DIECA 0,05 por ciento, y posteriormente, se separó el precipitado por centrifugación a 15.000 G por 15 min. El sobrenadante se mezcló con cloroformo en proporción de 3:1 y se agitó hasta conseguir una total emulsión de la mezcla; luego, se recentrifugó a 15.000 G por 15 min, para separar las fases de la emulsión. La fase acuosa se sometió a 2 ciclos de centrifugación diferencial (10 min a 15.000 G y 50 min a 100.000 G). El sedimento obtenido en la última centrifugación de altas revoluciones, se resuspendió en borato 0,01 M, pH 7,5 y se almacenó a 4°C.

Las centrifugaciones de altas y bajas revoluciones se realizaron en ultracentrífugas HITACHI 55—P2, rotor RP—40, y SORVALL RC—5B, rotor SS—34, respectivamente. La pureza del extracto purificado se determinó a través del espectro de absorción de la luz ultravioleta, en un espectrofotómetro ZEISS M4—Q3.

Serología. Las determinaciones serológicas se realizaron por el método de doble difusión en agar, con antisueros preparados contra PVY, CMV y TEV, y por el método de microprecipitación, con antisuero preparado contra el virus X de la papa (PVX).

La doble difusión en agar se realizó según Ball (1961), en medios serológicos propuestos por Gooding (1975) para virus del tabaco.

La detección de partículas virales alargado—flexuosas se preparó en agarosa al 0,6 por ciento, dodecil sulfato de sodio al 0,5 por ciento, azida sódica al 1 por ciento y cloruro de sodio al 0,85 por ciento. La detección de posibles partículas virales poliédricas se realizó en agar serológico similar al anterior, pero carente de cloruro de sodio. La microprecipitación se realizó con extracto viral preparado en tris—HCL al 0,05 por ciento, pH 7,2, más 2—mercaptoetanol al 1 por ciento y tween 20 al 0,05 por ciento. El extracto se clarificó por centrifugación a 3.000 G durante 15 min. Posteriormente, se depositaron 0,3 ml del extracto en una placa de Petri y se mezclaron con igual

volumen del respectivo antisuero. La mezcla se incubó bajo glicerina por 3 hr a 30°C y luego se refrigeró a 4°C por 2 hr. Las observaciones se realizaron en un microscopio estereoscópico, provisto de luz indirecta.

RESULTADOS

Rango de hospederos. Lesiones locales necróticas se desarrollaron en *S. demissum* x *S. tuberosum*, *V. sinensis*, *Ch. amaranticolor*, *G. globosa* (Figura 2A, B, D, E, respectivamente) y *P. vulgaris*. En *Ch. amaranticolor* se desarrollaron 2 tipos de lesiones locales, claramente diferenciables: a) manchas necróticas circulares rodeadas por un halo rojizo, y b) dobles anillos necróticos concéntricos (Figura 2D).

Síntomas sistémicos se obtuvieron en *N. tabacum*, *N. glutinosa*, *C. pepo*, *C. melo*, *C. sativus* (Figura 2C) y *D. stramonium*.

Propiedades físicas. La determinación de las propiedades físicas de la mezcla de virus dió los siguientes resultados: PIT, 50—55°C; PDF, 10—4—10—5. Para el virus separado en *C. sativus* cv. National Pickling se obtuvieron los mismos valores.

Microscopia electrónica. El método de inmersión permitió detectar la presencia de partículas virales alargado—flexuosas, con una longitud variable entre 480 y 740 nm (Figura 3A).

Dos tipos de inclusiones virales se observaron en cortes ultrafinos de tejido foliar enfermo: a) inclusiones cilíndricas o "pinwheels", ubicadas en el citoplasma de células infectadas (Figura 3B); y b) inclusiones cristalinas, ubicadas en la vacuola de células afectadas, constituidas por partículas de 25—30 nm de diámetro, perfectamente ordenadas en forma de cuerpos geométricos (Figura 4A y B). Junto a la presencia de inclusiones cristalinas se observó una alteración de los cloroplastos, caracterizada por una deformación de las granas (Figura 4A).

Purificación. El extracto purificado tuvo una máxima absorción de luz ultravioleta a $\lambda = 260$ nm y una mínima a $\lambda = 280$ nm. La relación A 260/A 280 fue de 1,06. En observaciones al microscopio electrónico del extracto purificado, se constató la presencia de partículas virales alargado—flexuosas de longitud variable entre 480 y 740 nm. La distribución de 70 partículas virales de acuerdo a su longitud, se presenta en el histograma de la Figura 5.

Transmisión por áfidos. La enfermedad se transmitió a 7 de 8 plantas inoculadas. Los síntomas comenzaron a aparecer a los 15 días después de su exposición a los áfidos. Un mes y medio después, las plantas tra-

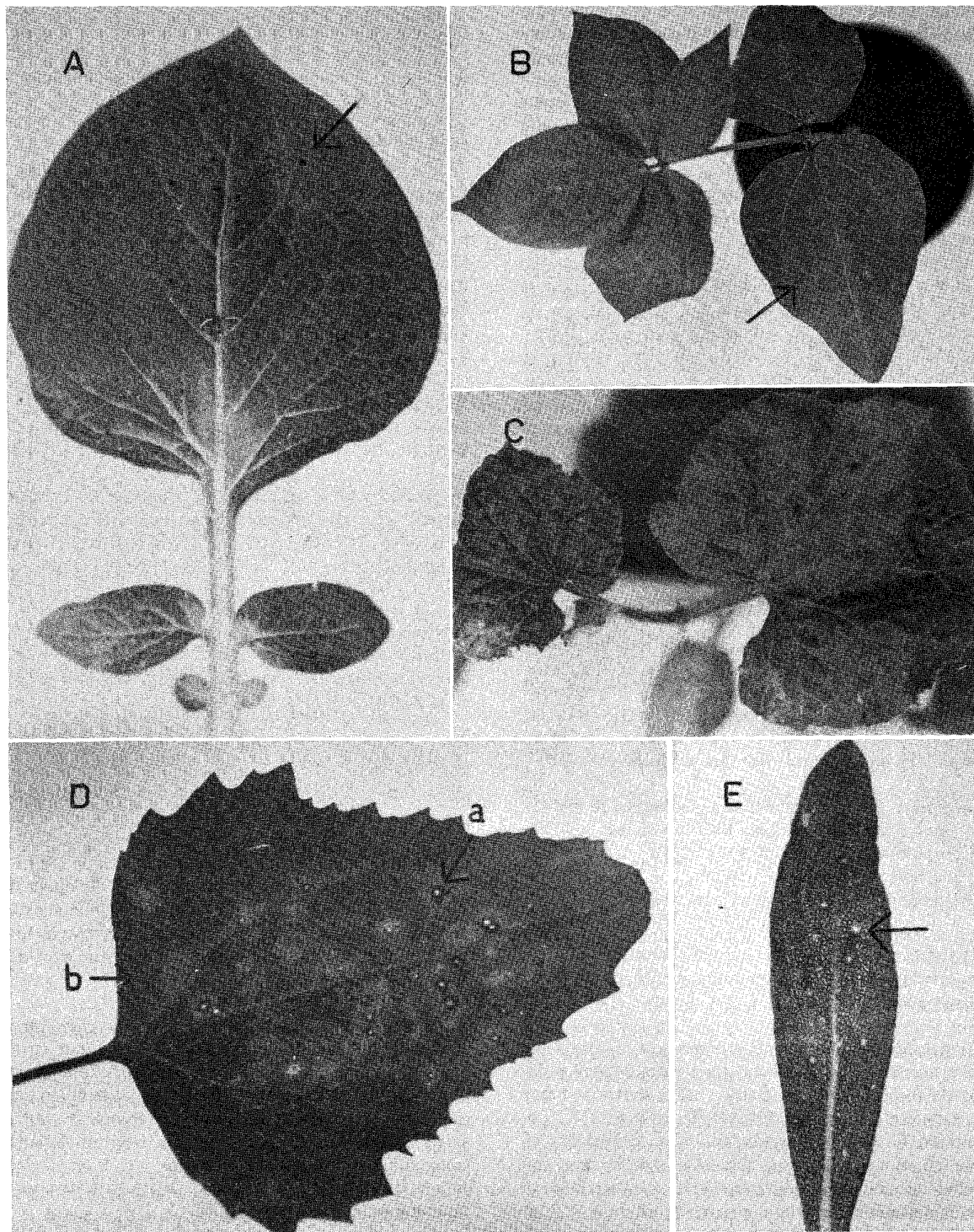


Figura 2. Síntomas desarrollados en hospederos diferenciales inoculados con extracto enfermo. A. Lesiones locales en *Solanum demissum* x *S. tuberosum*; B. *Vigna sinensis* mostrando lesiones locales necróticas en el primer par de hojas unifoliadas; (flecha); C. Síntomas sistémicos en *Cucumis sativus* cv. National Pickling; D. Hoja de *Chenopodium amaranticolor* mostrando 2 tipos de lesiones locales; a) manchas circulares necróticas, b) anillos necróticos concéntricos; E. Lesiones locales en *Gomphrena globosa*.

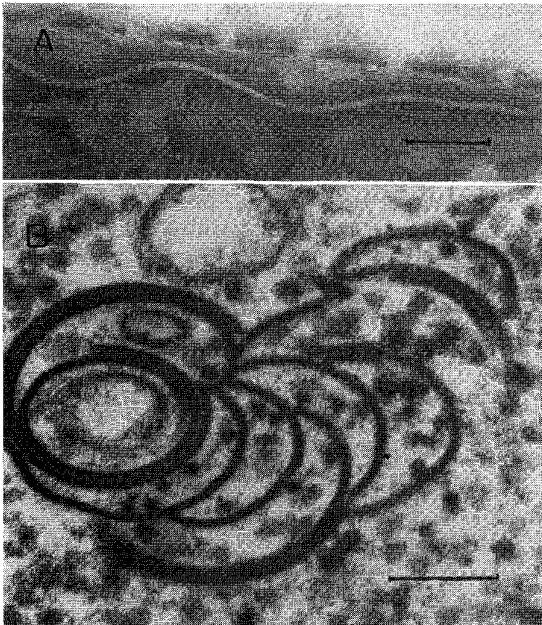


Figura 3. A. Partícula viral alargado—flexuosa observada mediante el método de inmersión (Barra = 100 nm). B. Inclusión cilíndrica, "pinwheel", observada en tejido foliar enfermo, característica de Potyvirus (Barra = 100 nm).

tadas mostraron clareamiento de venas, mosaico, deformación foliar y necrosis de venas secundarias y terciarias, así como del nervio central de las hojas enfermas (Figura 1B).

Serología. Se obtuvieron reacciones de identidad, caracterizadas por la formación de una sola línea de precipitación, mediante el método de doble difusión en agar, entre el extracto de plantas enfermas y los antisueros preparados contra PVY y CMV. Resultados negativos se obtuvieron con antisuero contra TEV. Mediante el método de microprecipitación, se identificó la presencia de PVX, observándose una reacción de total identidad entre el extracto viral y el antisuero preparado contra este virus.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron establecer la naturaleza viral de los agentes causales de la "necrosis severa" del tabaco. Al mismo tiempo, se determinó la existencia de 3 partículas virales diferentes, asociadas a la misma enfermedad y tentativamente identificadas como PVY, CMV y PVX. Los valores obtenidos en la determinación de

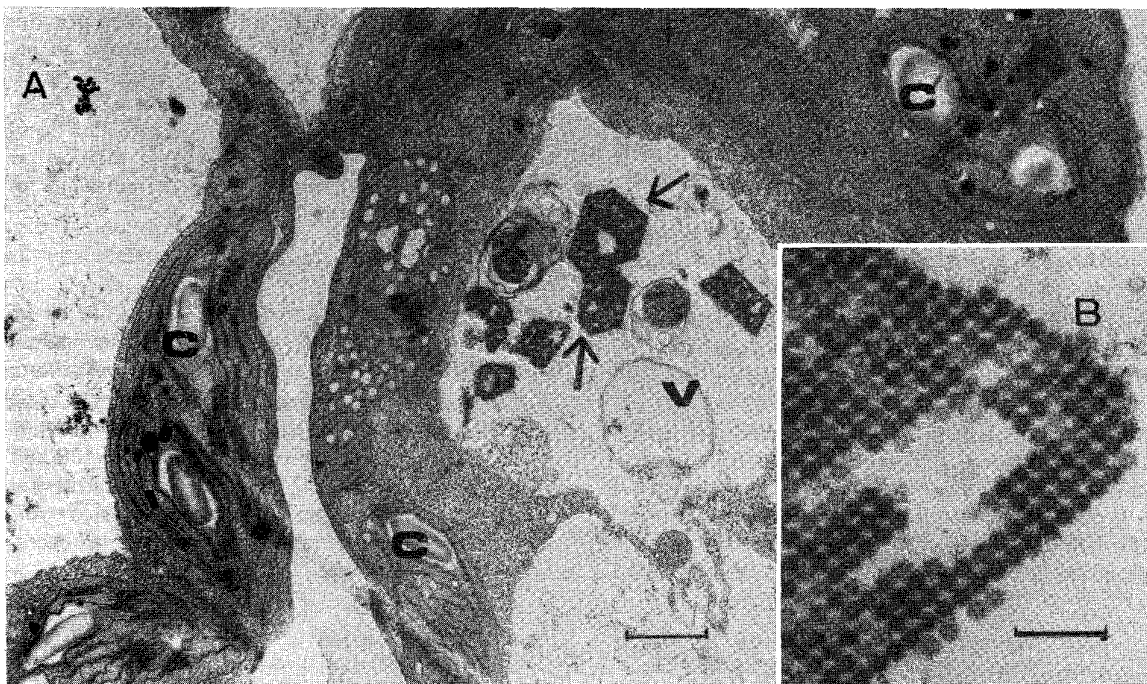


Figura 4. Inclusiones celulares y efectos ultraestructurales observados en secciones ultrafinas de hojas de tabaco infectadas. A. Vista general de una célula mostrando inclusiones cristalinas en la vacuola (v) y alteración de granos y lamelas en cloroplastos afectados (c), (Barra = 1000 nm). B. Sección de una estructura cristalina en que se observa la morfología isométrica de las partículas y el ordenamiento geométrico de ellas (Barra = 100 nm).

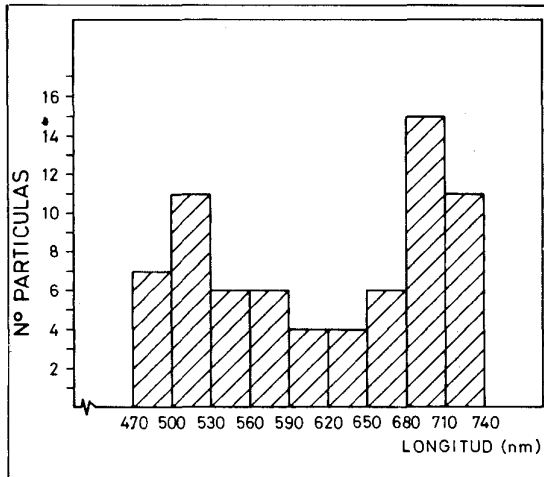


Figura 5. Histograma de largo de partículas virales alargado-flexuosas observadas en extracto viral purificado.

las propiedades físicas de esta mezcla de virus no tienen significado ya que corresponden a una mezcla de partículas virales y no a un solo virus.

La presencia de PVY se concluyó en atención a: a) presencia de partículas virales alargado-flexuosas con una moda entre 680 y 710 nm (Figura 3A y 5); b) presencia de "pinwheels" (Figura 3B), inclusiones virales características de los virus pertenecientes al grupo Potyvirus (Edwarson, Purcifull y Christie, 1967; Purcifull, Edwarson y Christie, 1969; Delgado y Grogan, 1970; Harrison y Roberts, 1970; Hievert y otros, 1970); c) desarrollo de síntomas locales en *S. demissum* x *S. tuberosum* (Figura 2A), planta indicadora considerada altamente específica para la detección de Potyvirus (Bartels, 1970); d) serológicamente se constató la presencia de PVY en plantas de tabaco inoculadas con áfidos o mecánicamente.

Los síntomas sistémicos desarrollados en *C. sativus* cv. National Pickling (Figura 2C), inmune a PVX, PVY y TEV (Gooding, 1975) permitieron postular la presencia de un Cucumovirus, probablemente de CMV. Esta hipótesis se corroboró a través de los siguientes resultados: a) desarrollo de lesiones locales necróticas en *V. sinensis* (Figura 2B), considerada un hospedero indicador relativamente específico de CMV (Gibbs y Harrison, 1970; Smith, 1972); b) presencia de inclusiones cristalinas (Figura 4A y B),

constituídas por partículas poliédricas, presumiblemente de naturaleza viral, similares a las descritas y fotografiadas por Ehara y Misawa (1973) y Honda y Matsui (1968 y 1973); c) resultados positivos en las determinaciones serológicas realizadas con antisueros de CMV, en plantas de tabaco inoculadas mecánicamente y por áfidos. Este virus se separó en *C. sativus* cv. National Pickling, mediante inoculación mecánica, a partir de tabaco inoculado con áfidos. La presencia de CMV en estas plantas se corroboró serológicamente y al mismo tiempo se establecieron las siguientes propiedades: PIT, 50–55° C (estos valores son inferiores a los señalados por otros autores para este virus); PDF, 10^{-4} – 10^{-5} ; lesiones locales en *V. sinensis* y síntomas sistémicos en *C. melo*, *C. pepo* y *N. tabacum*.

Por último, fue posible establecer la presencia de PVX debido principalmente a: a) la observación de partículas morfológicamente similares a PVY, pero con un valor modal entre 500–530 nm (Figura 5); b) las lesiones locales en *G. globosa* (Figura 2E) y en *Ch. amaranticolor* (Figura 2D), caracterizadas por manchas necróticas rodeadas por un halo rojizo y dobles anillos necróticos concéntricos, respectivamente, síntomas considerados altamente distintivos de este virus en estas plantas indicadoras (Smith, 1972), y c) análisis serológicos positivos.

El método de purificación utilizado, citado por Govier y Plumbs (1972), para partículas virales alargado-flexuosas permitió comprobar la presencia de tales partículas, obteniéndose una relación A260/A280 igual a 1,06 similar a los valores indicados para Potyvirus (Delgado y Grogan, 1970). Este método no permitió establecer la presencia de partículas morfológicamente diferentes.

La presencia y/o coexistencia de PVY y CMV en tabaco se ha comprobado mediante análisis serológicos en prospecciones recientes realizados por G. Apablaza y G.V. Gooding, sobre muestras de tabaco afectadas por "necrosis severa", colectadas en el Valle de Aconcagua durante las temporadas 1979/80 y 1980/81 (comunicación personal). Esto permite corroborar nuestros resultados sobre la existencia de estos virus, en las plantaciones de tabaco afectadas por la "necrosis severa" en el país.

RESUMEN

Durante los últimos 5 ó 6 años, los cultivos de tabaco en Chile, principalmente los ubicados en el Valle de Aconcagua, se han visto afectados por una enfermedad de naturaleza viral, denominada "necrosis severa" en atención a los síntomas y a la severidad de los daños producidos. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de clareamiento de venas, moteado clorótico, ampollamiento y mosaico foliar, necrosis de venas secundarias y terciarias visible particularmente en el envés de las hojas, lesiones necróticas en las venas centrales de las hojas y en los tallos, que, con el tiempo se extienden internamente hasta la médula y haces vasculares. Además, se presentan deformaciones foliares, enanismo generalizado y, en algunos casos, muerte de las plantas afectadas.

La detección de partículas virales alargado—flexuosas, de 680—710 nm de longitud, presencia de inclusiones virales cilíndricas o "pinwheels" y lesiones locales en

Solanum demissum x *S. tuberosum* (híbrido A—6), permitieron establecer la presencia del virus Y de la papa, en extracto obtenido de plantas enfermas. Del mismo modo, los síntomas sistémicos obtenidos en *Cucumis sativus* cv. National Pickling, *C. melo* y *Cucurbita pepo*, las lesiones locales observadas en *Vigna sinensis* y la presencia de inclusiones virales cristalinas, constituidas por partículas poliédricas de 25—30 nm de longitud, presumiblemente agregados de partículas virales, nos permitió establecer la presencia del virus del mosaico del pepino en las plantas enfermas. Finalmente, la existencia de partículas virales alargado—flexuosas con longitud entre 500—530 nm y de los síntomas obtenidos en *Gomphrena globosa* y *Chenopodium amaranticolor* nos permitieron postular la existencia de un tercer virion, como componente causal de la "necrosis severa", virus X de la papa. Estos resultados fueron corroborados serológicamente.

SUMMARY

Etiology of "necrosis severa" of tobacco

Tobacco plantings in Chile are being severely affected by a virus disease, commonly named "necrosis severa". Symptoms are characterized by the development of vein clearing, chlorotic mottling, mosaic, leaf puckering and veinal necrosis. Necrotic lesions on midribs and stems, eventually extending into the pith, usually develop on affected plants. A severe leaf distortion, stunting, and death are frequently found among diseased plants.

Evidences for the presence of potato virus Y (PVY), potato virus X (PVX) and cucumber mosaic virus (CMV) were found. Belief that PVY is involved as a causal agent of "necrosis severa" is based on the ob-

servation of rod—shaped and flexous viral particles of 680—710 nm in length and of Pinwheels, inclusion bodies, on diseased cells, and on the occurrence of local lesions on *Solanum demissum* X *S. tuberosum* (Hybrid A—6). Similarly, the presence of crystalline inclusion bodies, composed of isometric viral like particles of 25—30 nm, on diseased cells, systemic symptoms on *Cucumis sativus* 'National Pickling', *C. melo* and *Cucurbita pepo*, and local lesions on *Vigna sinensis*, suggested the presence of CMV. Finally, symptoms on *Gomphrena globosa* and *Chenopodium amaranticolor* and the presence of rod—shaped and flexous viral particles of 500—530 nm in length, suggested the presence of PVX on affected plants. These results were serologically corroborated.

LITERATURA CITADA

BALL, E.M. 1961. Serological test for the identification of plant viruses. The American Phytopathology Society. 16 p.

BARTELS, R. 1970. Symptom development by isolates of potato virus Y group on A—6 leaves. Review of Plant Pathology 49: 3440.

DELGADO, S.S. AND GROGAN, R.G. 1970. Potato virus Y. Descriptions of plant viruses N° 37. Commonwealth Mycological Institute. C.M.I./A.A.B. England, 4 p.

EDWARSON, J.R.; PURCIFULL, D.E. AND CHRISTIE, R. G. 1967. Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rod—shaped viruses. Virology 34: 250—263.

- EHARA, Y. AND MISAWA, T. 1973. Studies on the infection of cucumber mosaic virus—leaf growth and appearance of mosaic symptoms. *Review of Plant Pathology* 53: 2311.
- FERNANDEZ—VALIELA, M. 1969. Introducción a la fitopatología. 3a. ed. Colección Científica INTA. Buenos Aires. 1011 p.
- GIBBS, A.J. AND HARRISON, B.D. 1970. Cucumber mosaic virus. *Descriptions of Plant Viruses* Nº 1. Commonwealth Mycological Institute. C.M.I./A.A.B. England 4 p.
- GOODING, G.V., Jr. 1975. Serological identification of tobacco viruses. *Tobacco Science* 19: 135—139.
- GOVIER, D.A. AND PLUMBS, R.T. 1972. Henbane mosaic virus. *Descriptions of Plant Viruses* Nº 95. Commonwealth Mycological Institute. C.M.I./A.A.B. England. 4 p.
- HARRISON, B.D. AND ROBERTS, I.M. 1970. Pinwheels and crystalline structures induced by atropa mild mosaic virus, a plant virus with particles 925 nm long. *Journal of General Virology* 10: 71—78.
- HIEVERT, E.; PURCIFULL, D.E.; CHRISTIE, R.G. AND CHRISTIE, S.R. 1970. Partial purification of inclusions induced by tobacco etch virus and potato virus Y. *Virology* 43: 638—646.
- HITCHBORN, J.H. AND HILL, G.J. 1965. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts. *Virology* 27: 528—540.
- HONDA, Y. AND MATSUI, C. 1968. Electron microscopy of intracellular modifications of tobacco mixed infections with cucumber mosaic virus and tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 58: 1230—1235.
- HONDA, Y. AND MATSUI, C. 1973. Electron microscopy of cucumber mosaic virus—infected tobacco leaves showing symptoms. *Phytopathology* 64: 534—539.
- MERCER, E.H. AND BIRBECK, M.S.C. 1972. *Electron microscopy; a handbook for biologist*. 3rd. ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 195 p.
- MUJICA, F. 1961. Aporte preliminar al conocimiento de las virosis de los vegetales en Chile. Universidad de Chile. Facultad de Agronomía, *Boletín Técnico* 10: 13—15.
- PURCIFULL, D.E.; EDWARDSON, J.R. AND CHRISTIE, S.R. 1969. A morphological comparison of inclusions induced by tobacco etch and potato Y viruses. *Phytopathology* 60: 779—782.
- SMITH, K.M. 1972. *A textbook of plant virus diseases*. 3rd. ed. Academic Press. New York. 684 p.
- SPURR, A.R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal Ultrastructure Research* 26: 31—34.