

Efecto inhibitorio de savias vegetales sobre el virus de mosaico del tabaco (VMT)^{1/} ————— MAGDA CARVAJAL MORENO*

ABSTRACT

The inhibitory effect of 28 plant saps over the infectivity of Tobacco Mosaic Virus was studied. The mechanical inoculation was done on Nicotiana glutinosa to obtain a quantitative analysis with the local necrotic lesions produced by the virus.

The saps that presented an inhibitory effect against the Tobacco Mosaic Virus were: Chenopodium quinoa, Chenopodium amaranticolor, Opuntia sp, Solanum tuberosum, Spinacia sp, Solanum nigrum, Datura stramonium, Pelargonium geranium, Pennisetum clandestinum and Cuscuta sp.

Introducción

LAS enfermedades de las plantas causadas por hongos, bacterias y nemátodos fitopatógenos se han podido controlar en muchos casos. Por otro lado, el tamaño tan pequeño de los virus y el hecho de estar íntimamente relacionados con el metabolismo celular de la planta hospedante, hacen más difícil su control, aunque hay muchas enfermedades virales bajo control actualmente.

Los inhibidores de virus están ampliamente distribuidos en el reino vegetal; Simons *et al.* (20) señalan 75 especies vegetales de 30 familias diferentes como poseedoras de inhibidores de virus.

Duggar y Armstrong (6) observaron la inhibición de la infectividad del Virus de Mosaico del Tabaco (VMT) con extractos de *Phytolacca decandra*.

En muchas plantas hay compuestos fenólicos que reaccionan con las proteínas inactivándolas de varios modos. La cantidad de fenoles varía según la familia botánica y la edad del tejido, alcanzando con frecuencia altas concentraciones. Hay diferentes fenoles en las plantas, monómeros con uno o varios grupos hidroxilo en el anillo bencénico, o bien polímeros. Los taninos, o sea los fenoles de las plantas forman pequeños precipitados insolubles con las proteínas por puentes de hidrógeno, y pueden ser oxidados a quinonas que son compuestos altamente reactivos.

Los fenoles que pueden formar quinonas, pueden unirse en covalencia a proteínas a través de grupos -SH y grupos aminados libres.

Puede también ocurrir un ligamento cruzado de proteínas donde la quinona tiene un segundo grupo

reactivo. Estos tipos de reacción parece ser que suceden entre fenoles y las proteínas de los virus parásitos de las plantas (15), lo que traería consigo la inhibición del virus, pero no hay evidencia de que una especie de planta que contiene una alta concentración de fenoles sea de algún modo protegida de la infección viral en la naturaleza.

Sin embargo, existen investigaciones que muestran la importancia de los fenoles oxidados como causa de la pérdida de infectividad de varios virus en extractos crudos (10).

Los extractos de diferentes plantas inhiben la infección viral cuando se aplican en otras plantas, pero no sobre la misma de donde se extraen (9).

Sabiendo que algunos extractos vegetales contienen inhibidores de virus, se consideró importante hacer pruebas exploratorias con plantas de la región, para después estudiar detalladamente las que producen buena inhibición viral.

Materiales y métodos

Virus y plantas utilizadas

En el presente trabajo se usó el VMT por ser un virus fácil de manejar y que da lesiones locales en pocos días sobre *Nicotiana glutinosa*. Las lesiones locales permiten establecer un método cuantitativo para analizar con mayor precisión los resultados por medio de la estadística. Este método está basado en lesiones locales y es muy sensible ya que puede detectar una diferencia hasta del 10 por ciento entre dos concentraciones de virus activo en dos inóculos (18) (15). Además el número de infecciones locales detectables en los sitios de inoculación tienen correlación con la infectividad del inóculo (18).

La fuente de inóculo de VMT fueron plantas infectadas de tomate de la variedad 'Homestead', las

^{1/} Recibido para publicación el 16 de octubre de 1979.

* Departamento de Botánica. Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México.

cuales se mantuvieron en macetas con 300 g de suelo. La edad de las plantas de tomate y de *N. glutinosa* fue de 8 semanas, cuando tenían 10 o más hojas. A todas las plantas se les regó 3 veces por semana con una solución nutritiva, ya que el buen estado nutricional de la planta aumenta su susceptibilidad al virus (8). La solución nutritiva estuvo constituida por: nitrato de amonio (225 g), fosfato monobásico de amonio (225 g) y cloruro de potasio (225 g), los cuales se disolvieron en 20 lt de agua; de esta solución base se tomó una parte por 20 de agua y con ello se regaron las plantas.

Obtención del inóculo para las pruebas

El inóculo usado para probar los extractos vegetales se obtuvo aplicando VMT a plantas de tomate, y cuando mostraron los síntomas del mosaico, se cortaron las hojas, se pusieron a congelar por 24 horas, se molieron en un mortero y se filtraron con gasa.

Técnica de inoculación

Se aplicó carborundum de 400 mallas por pulgada sobre el área que se iba a inocular y después se frotó el inóculo con una mota de algodón.

La aplicación del virus en todos los tratamientos se hizo en la tarde, cuando ya no había mucha luz, puesto que la iluminación afecta al virus y a la susceptibilidad de la planta (1, 2).

Dilución del inóculo

Se hizo esta prueba para saber a qué dilución sería apropiado utilizar al virus, para obtener un número de lesiones locales entre 10 y 100 por mitad de hoja, que es considerado por Matthews (15) como el óptimo para *N. glutinosa*. Se probaron 6 diferentes concentraciones del inóculo: el extracto foliar de la planta donante sin diluir o sea la dosis original (DO) y diluciones de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000 y 1/100 000. Como solvente se usó una solución de un gramo de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua destilada que da un pH de 8,9.

En cada una de las 10 plantas de *N. glutinosa* se inocularon las 6 diferentes diluciones del virus en 10 medias hojas de diferente edad, y en cada hoja se utilizó sólo una mitad, nunca las dos mitades. Con estos datos se sacó el promedio de lesiones locales por mitad de hoja (15) para decidir cual era la mejor dilución a usarse (7). Se usó la dilución de virus 1/10 que nos dio 79,6 lesiones.

Extractos vegetales con posibles inhibidores. preparación y uso

Las partes vegetales a usarse, de las especies citadas en el Cuadro 1, se lavaron y se molieron en un mortero; posteriormente se exprimieron en gasa para obtener un filtrado que fue el que se empleó en las pruebas. Este extracto se utilizó siempre en su dosis original (DO) mezclando al virus, en una misma aplicación.

Se decidió usar el inóculo en una dilución 1:10, las proporciones de la mezcla final a aplicarse, fueron las siguientes: extracto de tomate con VMT (inóculo) = 0,5 ml, extracto de la planta a probarse (inhibidor) = 0,5 ml y una solución al 1 por ciento de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 9,0$ ml.

Cada mezcla así preparada se aplicó en 2 plantas de *N. glutinosa* de la misma edad (8 semanas), utilizando 5 hojas de cada planta, por tratamiento.

A cada hoja se le puso carborundum de 400 mallas por pulgada, después a la mitad derecha se le aplicó la mezcla del virus con el extracto de la planta a probar como inhibidor. Como testigo se usó invariablemente la mitad izquierda de cada una de las 10 hojas inoculadas, usando una mezcla igual pero sustituyendo el extracto vegetal por agua destilada.

Después de aplicar los extractos conteniendo inóculo y sus correspondientes testigos, se lavaron las hojas con agua corriente.

Los 28 extractos vegetales usados (Cuadro 1) se aplicaron indistintamente en hojas superiores, medias e inferiores para compensar el efecto de la edad de la hoja sobre la formación de lesiones locales.

El diseño estadístico usado fue un diseño completamente al azar con 10 repeticiones.

Obtención y manejo de la información

Después de 4 días de aplicados los tratamientos, se cortaron las hojas de cada una de las dos plantas de *N. glutinosa*, se les ordenó por separado entre hojas de papel manila y se colocaron en bolsas de plástico cerradas para evitar la deshidratación. Se les ordenó de la siguiente manera: con los números 1 a 5 a cada hoja de la primera planta y del 6 al 10 a las hojas de la segunda, correspondiendo las posiciones 1 y 6 a las hojas más viejas y la 5 y 10 a las más jóvenes. Se pesó a cada hoja y se contó el número de lesiones por gramo de tejido.

Para las comparaciones entre los datos obtenidos se usó la prueba estadística de Duncan. Con el objeto de tener una medida homogénea del número de lesiones observadas, se consideró el número de lesiones por unidad de peso. Se consideró conveniente usar un índice al que se llamó "Diferencia en número de lesiones por unidad", para aprovechar de manera óptima la información del conteo de lesiones locales, este índice se obtuvo utilizando la ecuación siguiente:

$$\text{Lesiones locales/g de tratamiento} = \frac{\text{Lesiones locales/g de testigo correspondiente} - \text{Diferencia en número de lesiones por unidad}}{\text{Diferencia en número de lesiones por unidad}}$$

La diferencia puede ser un número positivo o bien negativo; si es negativo (—) indica que el tratamiento con el extracto vegetal tuvo un efecto inhibitorio contra el VMT, comparado con su testigo, es decir, que presenta un número menor de lesiones por gramo. Si la diferencia es cero o es un número

Cuadro 1.—Plantas de donde se obtuvieron los extractos vegetales usados para buscar inhibidores de VMT.

Nombre científico	Nombre común en México	Parte utilizada
<i>Apium graveolens</i> L.	Perejil	Hojas
<i>Chenopodium amaranticolor</i>		"
<i>Chenopodium ambrosioides</i> Bert.	Epazote	"
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.		"
<i>Coffea arabica</i> L.	Café	"
<i>Corisandrum sativum</i> L.	Cilantro	"
<i>Cuscuta</i> sp. L.		Toda la planta
<i>Datura stramonium</i> L.	Tolache	Hojas
<i>Erythroxylum coca</i> Lam.	Coca	"
<i>Eucalyptus</i> sp. L'Hérit	Eucalipto	"
<i>Iris</i> sp. L.	Lirio acuático	"
<i>Ligustrum japonicum</i> Buch.	Truero	Flores
" " "	"	Hojas
" " "	"	Pecíolos
<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.	Níspero	Hojas
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Tabaco	"
<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi L.	Tabaco	"
<i>Opuntia</i> sp. Mill.	Nopal	"
<i>Pelargonium geranium</i> L'Hérit	Geranio	"
<i>Pennisetum clandestinum</i> Hochst	Pasto	"
<i>Pinus</i> sp. L.	Pino	"
<i>Salix</i> sp. L.	Sauce	"
<i>Solanum nigrum</i> Acerb. ex Dun.	Chichiquelite	"
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Papa	"
<i>Spinacia oleracea</i> L.	Espinaca	"
<i>Tagetes lucida</i> Cav.	Cempoalxochitl	"
<i>Ustilago maydis</i> Cda.	Huitlacoche	Esporas
<i>Zea mays</i> L.	Maíz	Hojas

positivo (+) es que no hubo inhibición, o bien que algunos tratamientos favorecieron la formación de lesiones locales, es decir, que hay mayor número de lesiones locales que en los testigos.

Resultados y discusión

Acción inhibitoria de los extractos vegetales.

De los 28 extractos probados, los 11 que presentaron efecto inhibitorio fueron: *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *Opuntia* sp., *Solanum tuberosum*, *Spinacia* sp., *Solanum nigrum*, *Datura stramonium*, *Pelargonium geranium*, *Pennisetum clandestinum*, *Cuscuta* sp. y *Tagetes* sp.

Los resultados del análisis de varianza para estos 11 extractos y su nivel de significancia al 5 por ciento de probabilidad se muestran a continuación (Cuadro 2)

Es curioso observar que hay una correspondencia entre la relación taxonómica de las plantas y la presencia o ausencia de inhibidores; coinciden por ejemplo los resultados en la familia Chenopodiaceae con *Ch. quinoa* y *Ch. amaranticolor* en nuestro estudio, y *Ch. album* estudiada por Thomson y Peddie (21), en que las tres especies contienen inhibidores; también coinciden en la familia Solanaceae con *S. tuberosum* y *S. nigrum* en nuestro estudio y *Capsicum*

Cuadro 2—Efecto inhibitorio de los extractos vegetales sobre la infectividad del VMT en *Nicotiana glutinosa*.

Planta de la que se obtuvo el extracto	Media de 10 repeticiones dada en lesiones/gramo	Nivel de significancia al 5% de probabilidad
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	— 568,42	a
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	— 568,12	a
<i>Opuntia</i> sp. Mill	— 500,46	a b
<i>Solanum tuberosum</i> L.	— 307,62	a b
<i>Spinacia oleracea</i> L.	— 270,99	a b
<i>Solanum nigrum</i> Dun	— 172,91	a b
<i>Datura stramonium</i> L.	— 163,46	a b
<i>Pelargonium geranium</i> L Hér	— 127,49	a b
<i>Pennisetum clandestinum</i> Ch	— 123,51	a b
<i>Cuscuta</i> sp. L.	— 60,97	a b
<i>Tagetes lucida</i> Cav.	— 39,59	b

Este cuadro muestra que sólo *T. lucida* es diferente estadísticamente del resto en su acción inhibitoria y que las dos especies de *Chenopodium* fueron las mejores.

frutescens estudiado por Simons *et al.* (20) y Marchoux (14). A este respecto Blaszcak *et al.* (3) dicen que las sustancias inhibitorias no son esporádicas en una especie, ya que cada vez que se usan dos o más del mismo género, el nivel de actividad inhibitoria entre ellas es semejante. Igualmente Simons *et al.* (20) opinan que la diferencia en actividad inhibitoria entre especies relacionadas, es principalmente cuantitativa.

A continuación se discuten los resultados de cada una de las especies vegetales que mostraron acción inhibitoria.

Chenopodium quinoa y *Chenopodium amaranticolor*:

Se puede observar que las dos especies de *Chenopodium* fueron las de efecto más inhibitorio sobre el VMT y no difirieron estadísticamente de *Opuntia* sp., *Solanum tuberosum*, *Spinacia* sp., *Solanum nigrum*, *Datura stramonium*, *Pelargonium geranium* y *Pennisetum clandestinum*. De acuerdo con los trabajos sobre inhibidores de virus realizados por Nagano (16) el factor inhibitorio puede ser un complejo de proteína y polisacárido, siendo la porción polisacárido la activa, que inhibe la síntesis viral dentro de la célula. Este autor menciona que no está comprobado que el desarrollo viral se interfiera, y supone que el factor inhibitorio actúa sobre la fosforilación oxidativa.

Marchoux (14) menciona que las chenopodiáceas no manifiestan una alta actividad de la ribonucleasa, por lo que es posible que el inhibidor sea un poli-

sacárido. Por otro lado con el propósito de identificar al inhibidor del VMT en *Chenopodium*, Yoshii y Sako (22) determinaron algunas de las características de la sustancia inhibitoria como: el punto de inactivación térmica del inhibidor que está cerca de 100° C por 10 minutos; el inhibidor no se transloca, es activo en una dilución 1/100 y permanece activo cuando se aplica 48 horas antes de la inoculación. Además Thomson y Peddie (21) encontraron que el inhibidor es activo después de almacenar la savia a 20° C por 6 días, y que la mayor cantidad permaneció en el sobrenadante después de centrifugar la savia a 40 000 rpm por 4 horas.

También Yoshii y Sako (22) suponen que el mecanismo de inhibición se debe a que el compuesto actúa sobre el citoplasma de las células del hospedante, e inhibe la formación del complejo virus-receptor.

Opuntia sp.

El extracto de esta planta presentó una fuerte inhibición del VMT (Cuadro 2); ya existe un antecedente de esto en el trabajo de Simons *et al.* (20) quienes probaron a *Opuntia robusta*, obteniendo una inhibición total del VMT con extracto crudo y con extracto calentado 80° C por 10 minutos, el inhibidor no se desnaturalizó a esta temperatura. Simons *et al.* (20) señalan que el hecho de que el nopal sea atacado por un reducido número de virus, no es garantía de que contenga inhibidores, ya que son dos fenómenos desligados. Esto es apoyado por Matthews (15) quien menciona que no obstante que muchas especies de rosáceas son comúnmente infectadas por diferentes virus, sus extractos son generalmente potentes inhibidores de virus.

Solanum tuberosum

De acuerdo con los resultados presentados en el Cuadro 2, el extracto de esta especie presenta una inhibición de VMT considerable. No hay mucha información al respecto, sin embargo Matthews (15) menciona que la familia Solanaceae se cuenta entre las que poseen inhibidores de virus.

Spinacia oleracea

El extracto de esta planta se encuentra en quinto lugar de efectividad (Cuadro 2), como inhibidor del VMT, bajo las condiciones de nuestro ensayo. Ya desde 1947, Kuntz y Walker (12) habían probado esta planta para el mismo fin, y entre otras características señalan que la inhibición es reversible.

La acción inhibitoria de la espinaca podría explicarse por el hecho de que contiene fierro (17), y según Huff *et al.* (11) trazas de este elemento pueden ser un factor de inestabilidad del ARN. Sin embargo esta explicación no es satisfactoria porque, como se mencionó, Kuntz y Walker (12) demostraron que la acción de la espinaca sobre el VMT es reversible, y Matthews (15) aunque supone que la acción del fierro que ocurre en presencia de luz, ocurre también in vivo, aclara que este efecto sobre el ARN del VMT es irreversible.

Solanum nigrum

Con el extracto de esta planta se obtuvo buena inhibición, estadísticamente igual a la de los mejores extractos. No se encontraron en la literatura, ningunos antecedentes del efecto de esta planta como inhibidor del VMT o de cualquier otro virus. Matthews (15) informa que la familia Solanaceae es rica en especies con inhibidores. Esta fue una de las razones por las que se incluyó esta especie en la investigación. Cabe mencionar que esta planta fue seleccionada para hacer una investigación posterior y conocer en qué fracción del extracto se encuentra el inhibidor.

Datura stramonium

Este extracto mostró una fuerte inhibición del VMT, estadísticamente igual al presentado por las chenopodiáceas (Cuadro 2). A este respecto Marchoux (14) menciona que esta planta tiene poderosos inhibidores y que junto con *Capsicum* y *Phytolacca decandra*, presenta mayor actividad de la ribonucleasa, que cualquier otra especie de planta estudiada hasta entonces. Por otro lado Loring (13) opina que la inactivación del virus por *Datura* puede deberse a la formación de un complejo virus-enzima y Casterman y Jeener (4) suponen que el VMT puede pasar por un estado inicial en el que es susceptible a la ribonucleasa. Estos últimos autores señalan que en general, las hojas contienen nucleasas y el ARN viral desnudo es muy susceptible a la acción de estas.

Por su parte Matthews (15) señala, que cualquier agente que rompa la proteína del VMT puede producir una aparente inactivación del virus, ya que el rompimiento de la cubierta de proteína, probablemente permita a las nucleasas contaminantes inactivar al ARN de la partícula viral. De acuerdo con este autor, las nucleasas fragmentan el esqueleto de fosfodiéster de la cadena de ARN y el rompimiento de una simple cadena viral es suficiente para una inactivación irreversible. Sin embargo, considera que no hay evidencia de que las ribonucleasas de las hojas jueguen algún papel en la resistencia de las plantas a la infección viral. Esto último es apoyado por el trabajo de Santilli *et al.* (19) quienes encontraron un alto contenido de ribonucleasas en las hojas de frijol susceptible al VMT.

Pelargonium geranium

En el Cuadro 2 vemos que el geranio muestra una inhibición del VMT considerable, esto coincide en cierta forma con el trabajo de Simons *et al.* (20) quienes encontraron que una fuente de inhibición se presentaba con *Pelargonium hortorum*.

Cuscuta sp

Aunque la *Cuscuta* presentó una inhibición menor que los extractos de las plantas discutidas anteriormente, en el análisis estadístico no hubo una diferencia significativa al nivel de significancia de 5 por ciento de probabilidad, con las chenopodiáceas (Cuadro 2). Los hechos de que *Cuscuta* transmita virus y posea además inhibidores, no son opuestas; Corbett

(5) cita un trabajo de Miyakawa y Yoshii que dice que varias especies de *Cuscuta* contienen sustancias que inhiben a la infección viral cuando se mezclan con los virus *in vitro*.

Pennisetum clandestinum y *Tagetes* sp.

No hay información sobre la inhibición de VMT causada por los extractos de estas plantas; sin embargo, se puede observar en el Cuadro 2, que la inhibición causada por *Pennisetum clandestinum* no difiere significativamente de la causada por las chenopodiáceas, mientras que *Tagetes* sp. presentó menor inhibición, que difirió significativamente del resto.

Conclusión

De los 28 extractos vegetales probados, los que presentaron efecto inhibitorio contra el VMT fueron en orden de eficacia: *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *Opuntia* sp., *Solanum tuberosum*, *Spinacia* sp., *Solanum nigrum*, *Datura stramonium*, *Pelargonium geranium*, *Pennisetum clandestinum* y *Cuscuta* sp.

Literatura citada

- 1 BAWDEN, F. C. y ROBERTS, F. M. The influence of light intensity on the susceptibility of plants to certain viruses. *The Annals of Applied Biology* 3:1: 286-296. 1947.
- 2 BAWDEN, F. C. y ROBERTS, F. M. Photosynthesis and predisposition of plants to infection with certain viruses. *The Annals of Applied Biology* Vol 35: 418-426. 1948.
- 3 BLASZCZAK, W., ROSS, A. F. y LARSON, R. H. The inhibitory activity of plant juices on the infectivity of potato virus X. *Phytopathology* 49: 784-791. 1959.
- 4 CASTERMAN, C. y JEENER, R. An initial ribonuclease sensitive phase in the multiplication of tobacco mosaic virus. *Virology* 3: 197-206. 1957.
- 5 CORBETT, M. K. y SISLER, H. D. Eds. *Plant Virology*. University of Florida Press. Gainesville, Florida. 527 pp. 1961.
- 6 DUGGAR, B. M. y ARMSTRONG, J. K. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 12 (1): 359. 1925.
- 7 FULTON, R. W. The effect of dilution on necrotic ringspot virus infectivity and the enhancement of infectivity by noninfective virus. *Virology* 18: 477-485. 1962.
- 8 FULTON, R. W. Transmission of plant viruses by grafting, dodder, seed, and mechanical inoculation. In Corbett, M. K. y Sisler, H. D. Eds. *Plant Virology*. University of Florida Press. Gainesville, Florida. 39-67. 1964.
- 9 GENDRON, Y. y KASSANIS, B. The importance of the host species in determining the action of virus inhibitors. *The Annals of Applied Biology* 41:183. 1954.

10. HAMPTON, R. E. y FULTON, R. W. The relation of polyphenoloxidase to instability in vitro of prune dwarf and sour cherry necrotic ringspot viruses. *Virology* 13: 44-52. 1961.
11. HUFF, J. W. *et al.* The action of metal ions on tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *Biochemistry* 3: 501-506. 1964.
12. KUNTZ, J. E. y WALKER, J. C. Virus inhibition by extracts of spinach. *Phytopathology* 37: 561-579. 1947.
13. LORING, H. S. The reversible inactivation of tobacco mosaic virus by crystalline ribonuclease. *Journal of General Physiology* 25:497-505. 1942.
14. MARCHOUX, G. Correlation between the ribonuclease actions inhibiting virus infection exercised by foliar extracts from different species. *Annals of Phytopathology* 1 (2): 257-266. 1969.
15. MATTHEWS, R. E. F. *Plant Virology*. New York, Academic Press. 778 pp. 1970.
16. NAGANO, Y. Studies on virus inhibiting factor. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 37 (2): 181-187. 1967.
17. OLASCOAGA, J. Q. Tabla de valores nutritivos para cálculos dietéticos. Ed. J. Q. Olascoaga, México. 18 p. 1967.
18. ROBERTS, D. A. Local-lesion assay of plant viruses. *In*: Corbett, M. K. and Sisler, H. D. Eds. *Plant Virology*. University of Florida Press. Gainesville, Florida: 194-210. 1964.
19. SANTILLI, V., NEPOKROEFF, C. M. y GAGLIORDI, N. C. Susceptibility of pinto bean leaves to tobacco mosaic virus and its relationship to leaf ribonuclease content. *Nature* 193: 656-658. 1962.
20. SIMONS, J. N., SWIDLER, R. y MOSS, L. M. Succulent type plants as sources of plant virus inhibitors. *Phytopathology* 53 (6): 677-683. 1963.
21. THOMSON, A. D. y PEDDIE, B. A. Studies on a virus inhibitor from *Chenopodium* leaves. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 8(4):825-831. 1965.
22. YOSHII, H. y SAKO, N. Inhibitory effect of *Chenopodium* sap on virus infection. Hypersensitive reaction of plant cytoplasm against incompatible inhibitor, *Chenopodium* sap. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33(4):244-252. 1967.