

Detección de enfermedades virales afectando al pimentón en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara, Venezuela, utilizando la técnica ELISA.

Y. Rodríguez¹, E. Rangel², F. Centeno², O. Mendoza¹ y A. Parra¹.

¹Centro de Investigaciones Agrícolas del estado Lara (CIAE).

²Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP).

Resumen

El pimentón es un cultivo importante en el estado Lara, donde históricamente se cosecha cerca del 50 % de la producción nacional. Este cultivo ha sido afectado en años recientes por el incremento de un complejo de síntomas aparentemente virales consistentes en enanismo, mosaico severo, ápice encrespado, hojas filiformes, ampollamiento y deformación de hojas. Para actualizar la información acerca de cuales virus afectan al cultivo, se colectaron 85 muestras en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara, que fueron analizadas usando estuches comerciales de ELISA para la detección de ocho diferentes virus, varios de los cuales han sido señalados en el país afectando al pimentón y otras importantes solanáceas. Algunas de las muestras fueron inoculadas en plantas indicadoras y sus partículas observadas al microscopio electrónico de transmisión. La prueba del ELISA permitió detectar al Cucumovirus del mosaico del pepino (Cucumber mosaic *cucumovirus*, CMV), tobavirus sonajero del tabaco (Tobacco rattle *tobravirus*, TRV), los potyvirus Y de la papa (Potato Y *potyvirus*, PVY) y del grabado del tabaco (Tobacco etch *potyvirus*, TEV), los tobamovirus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic *tobamovirus*, TMV) y del moteado suave del pimentón (Pepper mild mottle *tobamovirus*, PMMOV), y los nepovirus de la mancha anillada del tomate (Tomato ringspot *nepovirus*, ToRSV) y la mancha anillada del tabaco (Tobacco ringspot *nepovirus*, TRSV). El TRV, ToRSV y el TRSV son detectados en pimentón por primera vez en el país.

Palabras clave: Pimentón, *Capsicum annuum*, virus, ELISA, detección.

Recibido el 29-5-2002 • Aceptado el 9-6-2003.

¹Autor de correspondencia. Centro de Investigaciones Agrícolas del estado Lara (CIAE). Apartado 592. Barquisimeto, estado Lara.

Introducción

En el estado Lara, Venezuela, está ubicada la zona de mayor producción de hortalizas de pisos altitudinales bajos, aportando cerca del 52% del pimentón *Capsicum annuum* L. que se consume en el país (19).

Sin embargo, el dinámico sistema de cultivo (ciclo corto, siembra continua durante todo el año y manejo intensivo de la plantación) lo hacen susceptible al ataque continuo de plagas, varias de ellas transmisoras de enfermedades. Dentro de estas, las de etiología viral, son consideradas como limitantes ya que causan disminución de la calidad del fruto, y cuando su incidencia es alta reducen el rendimiento, que en algunos casos puede estar cerca del 28% (6, 10), considerándose que las pérdidas pueden ser mayores cuando se presentan infecciones múltiples en el campo.

En el país, se han señalado los siguientes virus afectando al pimentón: el virus del mosaico del tabaco (tobacco mosaic virus, TMV), género *Tobamovirus*; los virus Y de la papa (potato virus Y, PVY) y del grabado del tabaco (tobacco etch virus, TEV), pertenecientes al género *Potyvirus*; el virus del mosaico del pepino (cucumber mosaic virus, CMV), género *Cucumovirus*; el virus del mosaico suave del pimentón «VMSP» (pepper mild mosaic virus, PMMSV) (7, 9, 10, 13, 14, 27), éste último considerado como un posible miembro de la familia *Potyviridae* (28), el virus X de la papa (potato X

virus, PVX), género *Potexvirus* (20), y el virus del moteado suave del pimentón (pepper mild mottle virus, PMMoV), género *Tobamovirus* (18).

En el país también han sido señalados los siguientes virus en tomate: el virus del mosaico amarillo del tomate (VMAT o tomato yellow mosaic virus, ToYMV), género *Begomovirus* (8), TMV, TEV y CMV, (6, 13, 15) con base en criterios combinados de transmisión por vectores, observación de la morfología de la partícula en el microscopio electrónico de transmisión, evaluación de síntomas sobre huéspedes diferenciales y serología. También han sido detectados PVX, PVY, (20), el virus de la atrofia del brote terminal del tomate (tomato aspermy virus, TAV), género *Cucumovirus*; el virus del rayado del tabaco (tobacco streak virus, TSV) género *Ilarvirus*; virus del mosaico amarillento del calabacín (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), género *Potyvirus*; el virus del mosaico del tomate (tomato mosaic virus, ToMV), género *Tobamovirus*; y el virus de la mancha anular del tomate (tomato ringspot virus, ToRSV), género *Nepovirus* (21), utilizando la técnica ELISA para su detección.

En 1999, se realizó un muestreo con la finalidad de actualizar información sobre algunos de los posibles virus presentes en el cultivo del pimentón en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara, y posteriormente establecer estrategias de manejo integrado de estas enfermedades.

Materiales y métodos

Colecta de muestras de campo. En los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara, fueron colectadas muestras de hojas de pimentón de los cultivares 'Capistrano', 'Camelot', 'Júpiter NK', y 'Cacique', que indistintamente del cultivar presentaban síntomas aparentemente virales de mosaico, pronunciamiento de venas, cogollos encrespados, hojas filiformes, plantas achaparradas y frutos pequeños y deformes. También fueron colectadas hojas de *Datura innoxia* Miller dentro de las plantaciones muestreadas que presentaban síntomas de enrollamiento y mosaico. En total, fueron colectadas 85 muestras que fueron guardadas en bolsas plásticas, etiquetadas por municipio de procedencia y mantenidas en una cava con hielo hasta su procesamiento en el laboratorio.

Microscopía electrónica. La observación de las partículas vírales se hizo sobre un reducido número de muestras de campo, y en plantas inoculadas en el laboratorio, con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-300 a 15.000 X, mediante preparaciones de enjuague y posterior tinción negativa con acetato de uranilo al 2% en tampón fosfato a 0,1 M y pH 7,5.

Serología (ELISA). Para determinar la presencia de virus mediante serología, se utilizaron estuches comerciales de diagnóstico provenientes de Agdia, Inc. específicos para 8 virus: Virus sonajero del tabaco (tobacco rattle virus, TRV), género

Tobravirus; virus de la mancha anular del tabaco, (tobacco ring spot virus, TRSV), género *Nepovirus*, PVY, TEV, PMMoV, ToRSV, CMV y TMV. Todos los sistemas empleados se basan en la técnica de doble sándwich directo (DAS-ELISA), con anticuerpos de captura policlonales. Para los casos de PMMoV y CMV, los anticuerpos secundarios o de detección son monoclonales, y para los restantes virus, policlonales. Los anticuerpos secundarios están conjugados a fosfatasa alcalina.

Se siguieron los protocolos descritos por el fabricante para cada sistema de detección, que esencialmente siguen la misma secuencia y fundamento teórico detallado en la literatura especializada (4, 12). Trozos de hojas (0,5 g) fueron maceradas con mazo y mortero fríos y estériles en tampón de extracción en proporción 1:10. El extracto se filtró a través de gasa y se colocó en las microplacas de titulación a razón de 100µl celda⁻¹ y se usaron dos celdas muestra⁻¹, al igual que los controles de tejido suministrados por el fabricante para cada virus: positivo (planta enferma), negativo (planta sana), además del control absoluto (tampón de extracción). Los controles liofilizados fueron hidratados previamente en tampón de extracción por 18 h a 4°C. El tiempo de incubación, enjuague y volumen de aplicación de los demás reactivos se hizo de manera uniforme según lo descrito en el protocolo suministrado por el fabricante. Las placas fueron

analizadas en un lector de placas de microtitulación con un filtro de 405 nm, haciendo blanco en el control absoluto. Debido al número de muestras analizadas, se usaron 2 placas para cada virus y se utilizó un único control para cada par de placas. Las placas provistas por el fabricante son de poliestireno (DYNEX, Immulon 2HB) de alta capacidad de fijación de proteína y de bajo

coeficiente de variación de absorbancia (intra y entre placas). Se consideraron como muestras positivas aquellas que presentaron lecturas promedio de absorbancia, mayores o iguales que el promedio más el doble de la desviación standard de las lecturas de absorbancia del control negativo (P_e , si $\text{Prom. } X_m \geq \text{Prom. } X_{(\text{sano})} + 2 \sigma_{(n-1)}$) (4, 31).

Resultados y discusión

Síntomas de campo y ocurrencia. Los síntomas predominantes en las plantas de pimentón, consistieron en un moteado clorótico de intensidad variable y mosaico, pronunciamiento de venas, cogollos encrespados, hojas filiformes y plantas achaparradas. Plantas de *D. innoxia* presentaban síntomas de enrollamiento y mosaico severo. También se observaron plantas con síntomas de mosaico que presentaban frutos pequeños y deformes desde la primera etapa de crecimiento. En las siembras visitadas en los tres municipios, la ocurrencia de estos síntomas osciló entre 30 y 70%.

Microscopía Electrónica Se observaron escasas partículas en forma de filamentos flexibles, en muestras de campo y en las plantas indicadoras de pimentón 'Yolo Wonder', 'Capistrano' y *Datura innoxia* que fueron inoculadas con extracto de *D. innoxia*

Serología Los promedios de absorbancia para los controles y el punto de corte se muestran en el cuadro 1. Este criterio es arbitrario y relativamente estricto, pero la

selección de otros puntos de corte comúnmente utilizados, es también empírica y arbitraria (4, 31).

Las pruebas de ELISA permitieron detectar los virus: CMV, TRV, PMMoV, TMV, PVY, ToRSV, TRSV y TEV.

Según estos resultados los virus que se encontraron en infección simple fueron el TMV, TRSV y CMV, los demás fueron encontrados en infección doble o múltiple hasta en combinaciones de ocho de ellos en una sola planta.

El cuadro 2 muestra las diferentes asociaciones de virus encontradas por municipio, detectados utilizando ELISA.

En el municipio Jiménez se encontraron asociaciones de 2 hasta ocho virus inclusive, y donde se encontró la menor presencia de estos fue en el municipio Iribarren se detectó la presencia de TMV, PMMoV, TRSV y TEV. Aquí, sólo TRSV ocurrió como infección simple y el resto en asociaciones dobles.

En el municipio Torres se detectó la presencia de CMV, TMV, PMMoV, TRSV, ToRSV y TEV, en

infección simple o en asociación de hasta tres virus planta¹.

El cuadro 3, muestra la incidencia de los diferentes virus detectados en pimentón en los municipios muestreados en el estado Lara.

La mayor diversidad e incidencia de virus se registró en el Municipio Jiménez, donde fueron detectados todos los virus considerados en este estudio. Así, entre los de más alta incidencia destacan PMMoV y TEV con 100%, ToRSV con 58,82%, TRSV con 50%, y

CMV con 35,29%; TMV, TRV y PVY presentaron incidencias menores de 30%. Esto convierte al municipio Jiménez en una fuente de dispersión de los virus detectados con alto riesgo e importancia económica ya que es un hecho conocido que provee plántulas para la siembra, no sólo a los restantes municipios del estado, sino también a otros estados del país (21). Esta situación es particularmente importante para los casos de PMMoV y TMV que son tobamovirus de muy fácil transmisión mecánica (17, 32,

Cuadro 1. Promedio de absorbancia de controles positivos (enfermos) y negativos (sanos), y punto de corte para los virus detectados según la desigualdad: P. enferma, si el Promedio de la absorbancia de la muestra es mayor o igual a la absorbancia promedio del control negativo + 2 veces la desv. estándar. [Pe: Si Abs Prom X_i , e» Abs Prom control neg + 2 $\sigma_{(n-1)}$]

Estuche para:	Control	Absorbancia de controles a 405 nm		Prom	$\sigma_{(n-1)}$	2 $\sigma_{(n-1)}$	Pto de Corte
		X_1	X_2				
CMV(Mab)	+	0,840	1,042	0,941			
	(sano) -	0,148	0,254	0,201	0,075	0,150	0,351
PVY(Mab)	+	1,012	0,922	0,967			
	(sano) -	0,200	0,210	0,205	0,007	0,014	0,219
TEV	+	1,725	1,667	1,696			
	(sano) -	0,536	0,434	0,485	0,072	0,144	0,629
TRV	+	1,101	1,275	1,188			
	(sano) -	0,491	0,395	0,443	0,068	0,136	0,579
PMMoV	+	1,432	1,674	1,553			
	(sano) -	0,433	0,390	0,412	0,030	0,061	0,473
TMV	+	1,655	1,853	1,754			
	(sano) -	0,422	0,277	0,350	0,103	0,205	0,555
ToRSV	+	1,389	1,231	1,310			
	(sano) -	0,816	0,591	0,576	0,022	0,044	0,620
TRSV	+	1,228	1,082	1,155			
	(sano) -	0,398	0,349	0,374	0,035	0,069	0,443

Cuadro 2. Asociaciones de virus en pimentón detectados en tres municipios del estado Lara.

Municipios			
Asociación	Jiménez	Iribarren	Torres
Simple			
Doble	PMMoV + TEV	TRSV TMV + TRSV TRSV + TEV PMMoV + TRSV	CMV, TMV, TRSV CMV + TMV ToRSV + TEV TMV + TRSV CMV + TRSV PMMoV + TMV + TRSV CMV + TMV + TRSV
Triple	PMMoV + TEV + CMV, PMMoV + TEV + ToRSV PMMoV + TEV + PVY PMMoV + TEV + TRSV + TMV PMMoV + TEV + TRSV + ToRSV PMMoV + TEV + TRSV + CMV PMMoV + TEV + TRSV + PVY PMMoV + CMV + TRSV + TMV PMMoV + TEV + ToRSV + TMV PMMoV + TEV + ToRSV + CMV PMMoV + TEV + CMV + TMV PPM _o V + TEV + TRSV + CMV + ToRSV + TRV		
4 Virus			
6 Virus			
7 Virus			
8 Virus			

Cuadro 3. Incidencia de virus en pimentón en tres municipios del estado Lara. 1999.

Virus	Municipios		
	Jiménez	Iribarren	Torres
PMMoV	100,00	11,11	31,25
TEV	100,00	11,11	16,67
TRSV	50,00	72,22	62,50
TMV	26,47	38,89	40,63
CMV	35,29	0	21,88
ToRSV	58,82	0	16,67
PVY	17,65	0	0
TRV	14,72	0	0

33). En el municipio Iribarren destaca el TRSV, detectado en el 72,22% de los casos, seguido del TMV con 38,39%, PMMoV y TEV, ambos con 11,11%. Los demás virus no fueron detectados.

En el Municipio Torres no fueron detectados TRV ni PVY; los demás virus fueron detectados en proporciones que fluctuaron desde 16,67 hasta 62,50%. Este municipio también es, de acuerdo a estos resultados, una importante fuente potencial de inóculo si llegase a producir plantas para otras localidades.

Llama la atención la baja incidencia del PVY, que sólo fue detectado en el municipio Jiménez (17,65%) y no en los restantes municipios. Este virus se transmite de manera no persistente y con facilidad por varias especies de áfidos, entre los cuales destaca *Myzus persicae* (Sulzer) (1), que ha sido identificado en el país (3) y para el momento del muestreo se encontraron alados del mismo en las plantaciones. La mayor incidencia de CMV con relación con PVY podría

eventualmente explicarse debido a que el primero tiene una mayor gama de huéspedes, para el cual se han señalado más de 190 especies en cerca de 40 familias hospederas, incrementando la probabilidad de transmisión de las malezas al cultivo (11, 17), lo que es de difícil ocurrencia para PVY, ya que su ámbito natural de hospederas se restringe a las solanáceas, aunque experimentalmente infecta especies de cuatro familias botánicas (1).

En una perspectiva más amplia, los tres virus detectados con frecuencia superior al 50% en los municipios muestreados fueron PMMoV, TRSV y TEV (cuadro 4).

El PMMoV no tiene agentes transmisores en la naturaleza, es transmitido por semilla en alta proporción (ca. 29% en pimentón), y se transmite de manera mecánica con facilidad a través de la manipulación en el trasplante (ca. 41%) y por los implementos utilizados en prácticas agronómicas como el cultivo mecanizado y/o el arropque entre otras

Cuadro 4. Incidencia de virus en pimentón, *Capsicum annum* L. en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara en 1999.

	TRV	CMV	PMMoV	TMV	PVY	ToRSV	TRSV	TEV
%	5,95	22,62	54,76	34,52	7,14	30,95	59,52	50,00

(32); todos estos factores podrían explicar su elevada incidencia. Por contraste, el otro tobamovirus detectado (TMV), presentó una menor incidencia a pesar de haber sido detectado en el país con anterioridad, probablemente debido a que se ha incorporado resistencia genética a TMV en algunos genotipos de *C. annum* desde hace algún tiempo (10).

En cuanto a la detección de los virus TRV (tobravirus), y TRSV, ToRSV (nepovirus) en pimentón, su importancia radica en que son transmitidos por semilla en proporción variable (17, 26, 29, 30), con riesgo potencial de diseminación por el uso de semilla no sometida a control de calidad fitosanitaria y por su movimiento como plántulas para exportar a otros estados.

El TRV es transmitido por nematodos pertenecientes a la familia *Trichodoridae* (17, 26); el TRSV y ToRSV son transmitidos por especies de nematodos en la familia *Longidoridae* (29, 30), por lo que la diseminación por estos agentes transmisores sería poco eficiente debido a la baja movilidad de los nemátodos por sí mismos a grandes distancias dentro de las plantaciones (17). Su importancia radica en que podrían ser diseminadores de virus a partir del inóculo primario,

fundamentalmente a plantas vecinas o a corta distancia cuando se usa riego por surcos, y eventualmente pueden ser movidos a grandes distancias con restos de suelo en implementos mecanizados.

Las dos familias de nematodos señaladas tienen representantes descritos en el país (2, 5, 22, 23, 25). Así, el TRV es transmitido por al menos 7 especies pertenecientes a los géneros *Trichodorus* y *Paratrichodorus* (16, 26); entre éstos géneros, sólo se ha identificado en Venezuela a *Paratrichodorus minor* (Colbran, 1956) Sidiqi, 1974 asociado a ornamentales (23). El TRSV es transmitido por *Xiphinema americanum* Cobb 1913 (30) y está presente en el país, aunque asociado al cultivo del guayabo (5).

Debido a la presencia de estos vectores en el país, y a la importancia del daño causado por los virus que estos transmiten al pimentón, es necesario un estudio detallado para dilucidar su posible rol en la epidemiología de estas enfermedades en el cultivo.

El TEV, fue detectado por ELISA y los síntomas observados de hojas filiformes en plantas afectadas son característicos para este virus, que ya había sido señalado previamente en el país (6, 13, 24).

Los resultados obtenidos en el

presente trabajo aportan evidencia corroborando investigaciones anteriores (7, 9, 10, 13, 18) en relación a la presencia previa del CMV, PVY, TMV, TEV y PMMoV infectando pimentón en el país.

La detección de los virus señalados en este trabajo se basó fundamentalmente en la prueba de ELISA, la cual resultó suficientemente específica con los sistemas utilizados, ya que permitió detectar de manera mutuamente excluyente en varios casos, muestras infectadas con virus

relacionados, tales como tobamovirus (PMMoV y TMV), potyvirus (TEV y PVY), y nepovirus (TRSV y ToRSV) (cuadro 2). En ambos nepovirus, se señala que las pruebas serológicas han sido determinantes para su identificación diferencial, ya que se ha señalado que varias razas del ToRSV están serológicamente, pero esta relación entre el ToRSV con otros nepovirus parece no existir (29, 30). El ToRSV a sido detectado en tomate con anteriormente en Venezuela (20).

Conclusiones

Se corrobora de investigaciones anteriores la presencia de CMV, PVY, TMV, TEV y PMMoV infectando pimentón en el país.

Se detectó al TRV, TRSV y

ToRSV afectando pimentón en el país, considerando necesario confirmar la presencia de los tres virus antes mencionados con estudios específicos para su identificación.

Literatura citada

1. Bokx, J. A. De, y H. Huttinga. 1981. Potato virus Y. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses N° 242. In: Adams, M. J., Antoniw, J. F., Barker, H., Jones, A. T., Murant, A. F., Robinson, D. (Eds.). 1998. Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM. Wellesbourne, Warwick, UK: Assoc. of Appl. Biol.
2. Cardona, R. y J. Renaud. 1993. Identificación de las especies de la familia *Trichodoridae* y su distribución en Venezuela. Fitopatol. Venez. 6:61 (Resumen).
3. Cermeli, L. M. 1984. Clave para la identificación de áfidos capturados en trampas en Venezuela. FONAIAP - Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Serie A N° 2-02. Maracay, Ven. 162 p.
4. Converse, R. H., y R.R. Martin. 1990. ELISA methods for plant viruses. In: Hampton, R., Ball, E., and De Boer, S. (Eds). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Pathogens. APS, St Paul, Minnesota, USA. pp. 179-196.
5. Crozzoli, R., A.M. Casassa, D. Rivas y J. Mateus. 1991. Nematodos fitoparasíticos asociados al cultivo del guayabo en el estado Zulia, Venezuela. Fitopatol. Venez. 4:2-6.
6. Debrot, E. 1976. Estudios sobre el virus del grabado del tabaco en siembras de tomate en Venezuela. Agronomía Trop. 26:321-335.
7. Debrot, E. 1982. Infección del pimentón con el virus del mosaico del pepino (VMP) en Venezuela. Agronomía Trop. 30:295-305.
8. Debrot, E., F. Herold y F. Dao. 1963. Nota preliminar sobre un «mosaico amarillento» del tomate en Venezuela. Agronomía Trop. 13:33-41.

9. Debrot, E. A., R. Lastra y P. Ladera. 1980. Detección de un nuevo potyvirus atacando al pimentón (*Capsicum annuum* L.) en Venezuela. *Agronomía Trop.* 30:85-96.
10. Debrot, E. A., F. Morales, D. Anzola, A. Perlasca y L. A. Betancourt. 1982. Resultados de pruebas para el control de virus de pimentón (*Capsicum annuum* L.) mediante el uso de variedades resistentes. *Agronomía Trop.* 32:249-260.
11. Francki, R. I. B., D. W. Mossop y T. Hatta. 1979. Cucumber mosaic virus. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses N° 213 (N° 1 revised). *In: Adams, M. J., Antoniw, J. F., Barker, H., Jones, A. T., Murant, A. F., Robinson, D. (Eds.). 1998. Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM. Wellesbourne, Warwick, UK: Assoc. of Appl. Biol.*
12. Harlow, E. y D. Lane. 1988. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. 726 p.
13. Herold, F. 1970. Tobacco etch virus in Venezuela. *Plant Dis. Rptr.* 54:344-345.
14. Ladera, P., R. Lastra y E. A. Debrot. 1982. Purification and partial characterization of a potyvirus infecting pepper in Venezuela. *Phytopath. Z.*, 104:97-103.
15. Lastra, R. y R. de Cuello. 1975. Viruses affecting tomatoes in Venezuela. *Phytopath. Z.*, 84:253-258.
16. Llácer, G., M. M. López, A. Trapero y A. Bello. 1996. Patología vegetal. Tomo I. Sociedad Española de Fitopatología. Phytoma-España. 679 p.
17. Matthews, R. E. F. 1991. *Plant Virology*. 3rd ed. Academic Press. USA. 835 p.
18. Merchán, Y. y M. de Mejía. 1997. Detección de virosis en *Capsicum annuum* (pimentón) en la I etapa del sistema de riego del río Cariaco, Edo. Sucre. *Fitopatol. Venez.* 10:48 (Resumen).
19. Ministerio de Agricultura y Cría. 1999. Anuario Estadístico Agropecuario 1997. Dirección de Estadística e Informática. 81p.
20. Nava, A., F. Ochoa, G. Trujillo, F. Geraud, L. Hernández, R. Lastra y G. Rivas. 1996. Detección de virus en zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Venezuela. I. Estados Aragua y Zulia. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 13: 285-292.
21. Nava, A., G. Trujillo, D. Chirinos y G. Rivero. 1998. Detección de virus en zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Venezuela. IV. estado Zulia. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 15:135-141.
22. Petit, R. P. 1990. Reconocimiento de nematodos fitoparasíticos asociados a frutales de importancia económica en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 3:2-5.
23. Petit, R. P. y R. Crozzoli. 1995. Nematodos fitoparasíticos asociados a cultivos de ornamentales en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 8:41-44.
24. Purcifull, D. E. y E. Hiebert. 1982. Tobacco etch virus. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses N° 258 (N° 55 revised). *In: Adams, M. J., Antoniw, J. F., Barker, H., Jones, A. T., Murant, A. F., Robinson, D. (Eds.). 1998. Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM. Wellesbourne, Warwick, UK: Assoc. of Appl. Biol.*
25. Renaud, J. y E. Briceño. 1993. El género *Xiphinema* en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 6:61 (Resumen).
26. Robinson, D. J., y B. D. Harrison. 1989. Tobacco rattle virus. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses N° 346. *In: Adams, M. J., Antoniw, J. F., Barker, H., Jones, A. T., Murant, A. F., Robinson, D. (Eds.). 1998. Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM. Wellesbourne, Warwick, UK: Assoc. of Appl. Biol.*

27. Salas, G., A. Arcia y G. Malaguti. 1972. Estudio preliminar sobre las virosis en pimentón (*Capsicum annuum*) en Venezuela. *Agronomía Trop.* 22:45-55.
28. Shukla, D., C. Ward y A. Brunt. 1994. The Potyviridae. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 516 p.
29. Stace-Smith, R. 1984. Tomato ringspot virus. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses N° 290. *In*: Adams, M. J., Antoniw, J. F., Barker, H., Jones, A. T., Murant, A. F., Robinson, D. (Eds.). 1998. Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM. Wellesbourne, Warwick, UK: Assoc. of Appl. Biol.
30. Stace-Smith, R. 1985. Tobacco ringspot virus. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses N° 309 (N° 17 revised). *In*: Adams, M. J., Antoniw, J. F., Barker, H., Jones, A. T., Murant, A. F., Robinson, D. (Eds.). 1998. Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM. Wellesbourne, Warwick, UK: Assoc. of Appl. Biol.
31. Sutula, C., J. Gillet, S. Morrissey y D. Ramsdell. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Dis.* 70:722-726.
32. Wetter, C. y M. Conti. 1988. Pepper mild mottle virus. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses N° 330. *In*: Adams, M. J., Antoniw, J. F., Barker, H., Jones, A. T., Murant, A. F., Robinson, D. (Eds.). 1998. Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM. Wellesbourne, Warwick, UK: Assoc. of Appl. Biol.
33. Zaitlin, M. y H. W. Israel. 1975. Tobacco mosaic virus (type strain). CMI/AAB. Descriptions of plant viruses N° 151 *In*: Adams, M. J., Antoniw, J. F., Barker, H., Jones, A. T., Murant, A. F., Robinson, D. (Eds.). 1998. Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM. Wellesbourne, Warwick, UK: Assoc. of Appl. Biol.