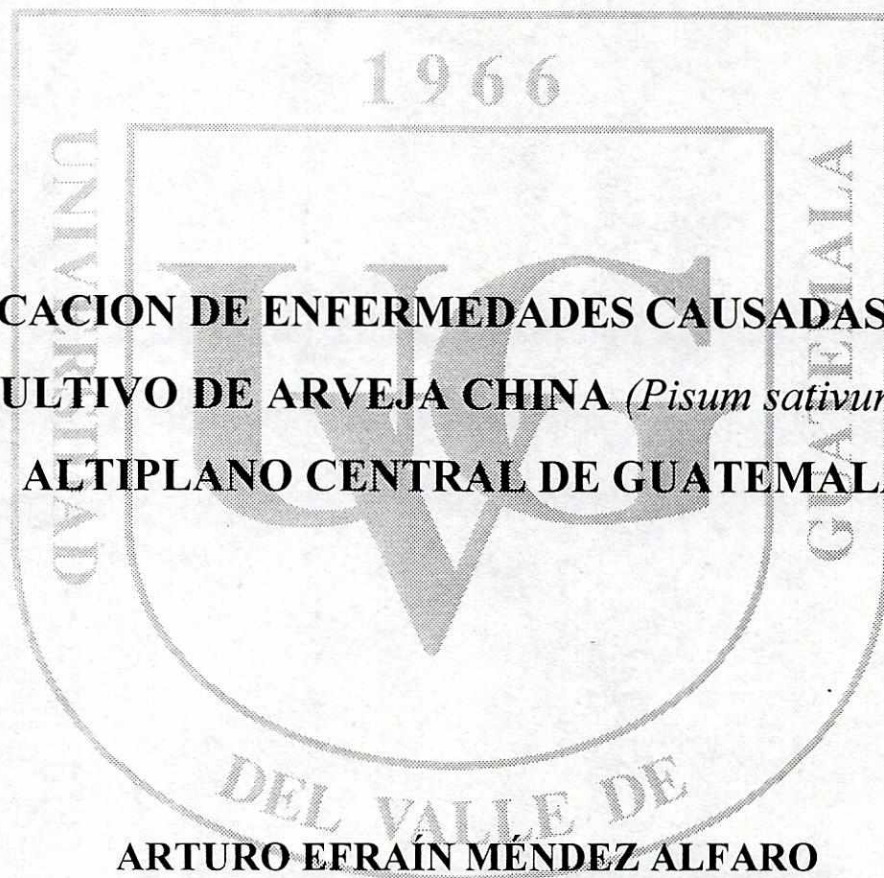


IDENTIFICACION DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS EN EL  
CULTIVO DE ARVEJA CHINA (*Pisum sativum* L.) EN EL ALTIPLANO  
CENTRAL DE GUATEMALA.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**



**IDENTIFICACION DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS  
EN EL CULTIVO DE ARVEJA CHINA (*Pisum sativum L.*) EN EL  
ALTIPLANO CENTRAL DE GUATEMALA**

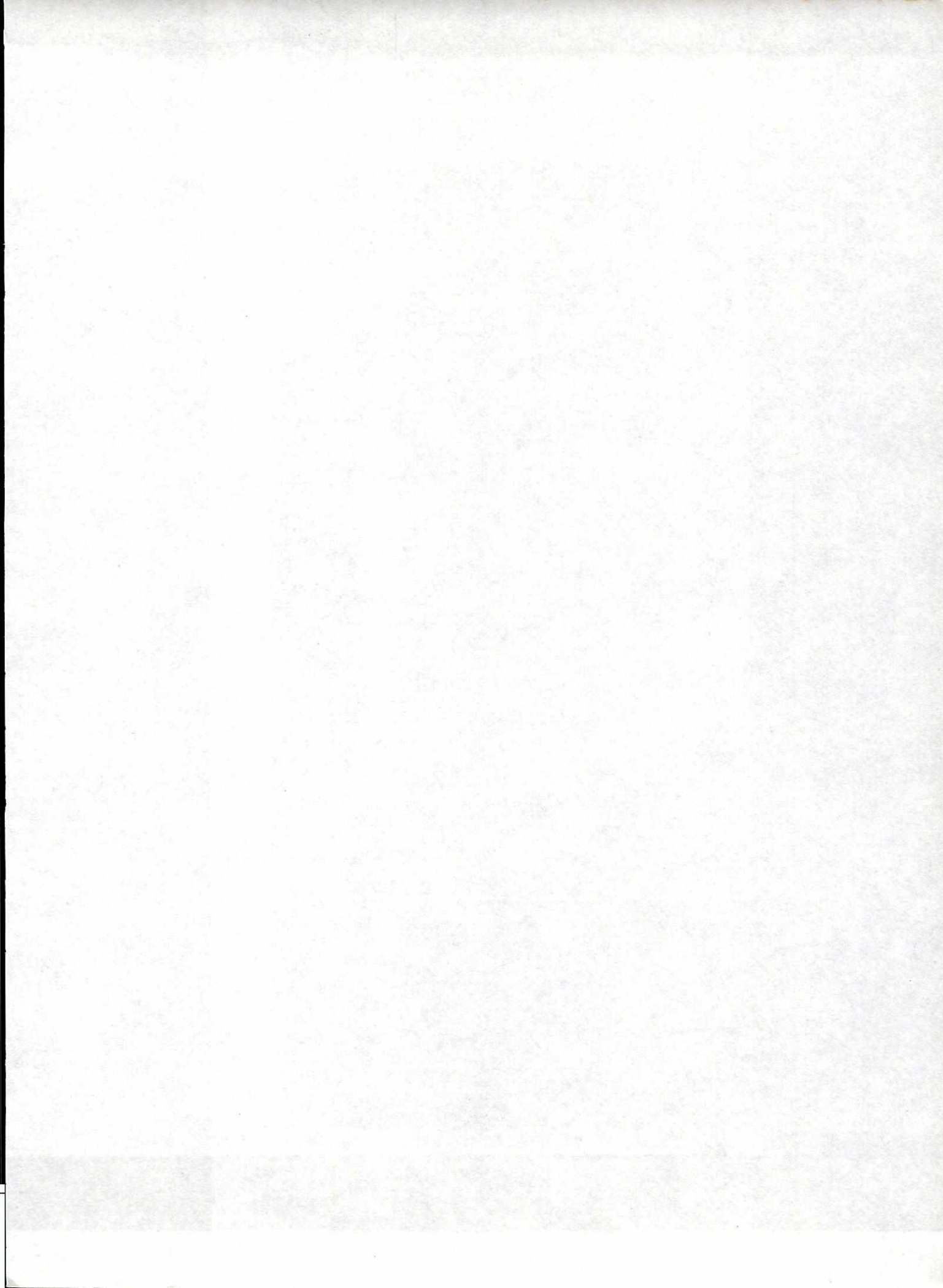
**ARTURO EFRAÍN MÉNDEZ ALFARO**

**Trabajo de graduación presentado para optar al grado académico  
de Licenciatura en Ciencias Agrícolas**




**GUATEMALA**

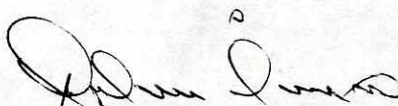
1996



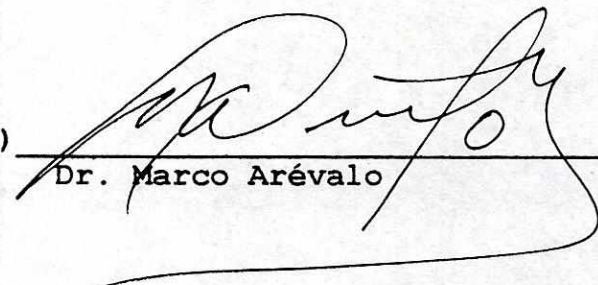
Vo.Bo.:

(f)   
Licda. Margarita Palmieri de Mata  
Asesora

Tribunal:

(f)   
Ing. Carlos Orlando Arjona

(f)   
Ing. Edil Rodríguez

(f)   
Dr. Marco Arévalo

Fecha de aprobación: 28 de mayo de 1996

A Dios  
A mis Padres  
A mis Hermanos  
A Marisabel

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a la Lic. Margarita de Mata, por su asesoría y todo su apoyo, y por la oportunidad que me dio de realizar mi trabajo. Al Ing. Arjona, por su ayuda y el uso de su cámara. A Letty, por todos los favores recibidos en este tiempo.

Al Dr. MacVean, por facilitarme el vehículo para el muestreo. A Edu, por permitirme usar el equipo de su laboratorio.

Al Dr. Rosario Provvidenti, de la Universidad de Cornell, por compartir sus conocimientos y experiencias, y por facilitar mucho del material que se utilizó en este trabajo.

Especialmente a Maricruz y Rita, por su sincera amistad, ayuda y compañía.

A las personas que permitieron el muestreo en sus campos de cultivo, a los técnicos de la Gremial y al Ing. Calderón por su colaboración.

A todas las personas, profesores, trabajadores de la Universidad, que de algún modo hicieron posible este trabajo.

Al CUCV, por ser mi casa todo este tiempo, y a los directores y residentes, por su amistad.

A mi papá (QEPD), mamá y hermanos, por todo su apoyo y cariño.

A la persona que me motivó, me alentó y me ayudó siempre. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ser mi consuelo en muchas ocasiones. Gracias Marisa.

## RESUMEN

El presente trabajo puede ser considerado como un estudio preliminar para la caracterización de virus que, por la observación de su sintomatología, están presentes en los campos de arveja china en el altiplano central de Guatemala.

Se hicieron inoculaciones mecánicas en invernadero con los virus BYMV (Virus del mosaico amarillo del frijol), CYVV (Virus del amarillamiento de vena del trébol), PMV (Virus mosaico de la arveja), PSbMV (Virus mosaico de la arveja transmitido por semilla) y PEMV (Virus del mosaico y enaciones de la arveja), donde se logró obtener sintomatología de los primeros cuatro, y determinar la susceptibilidad de las variedades Oregon Sugar Pod II (BYMV, CYVV, PMV, PSbMV); Melting Sugar (BYMV, CYVV, PMV); Snow Flake (PSbMV), así como la resistencia de esta última a BYMV, CYVV y PMV.

Se efectuaron muestras a 27 plantaciones en 15 localidades de los departamentos de Chimaltenango y Sacatepéquez, donde se encontró sintomatología en 6 plantaciones y 2 localidades. Estas muestras sintomáticas también se inocularon mecánicamente.

Las técnicas de tinción para observación de cuerpos de inclusión mostraron formas muy similares para BYMV, CYVV, PMV y las muestras infectadas del campo, generalmente cristales citoplasmáticos y nucleares, que no permitieron caracterizar individualmente a algún virus, sino determinaciones a nivel de grupo, en este caso Potyvirus.

Las pruebas serológicas mostraron reacciones cruzadas entre los anticuerpos policlonales y los controles positivos de BYMV, CYVV, PSbMV y PMV. El anticuerpo monoclonal para Potyvirus (PTY8) resultó más específico, detectando solamente los virus BYMV y PMV. La separación entre estos dos se hizo por rango de hospederos.

Se determinó que no se puede generalizar el hecho que PMV no infecta a *Phaseolus vulgaris*, por la susceptibilidad mostrada por las variedades Black Turtle 1, Black Turtle 2 y Tamazulapa. Se tomó en cuenta, principalmente, que la variedad California Light Red Kidney sí es resistente a PMV, pero susceptible a BYMV. Al inocular las muestras de campo no se logró inducir síntomas en esta variedad. Se determinó entonces, en base a ésto, que el PMV es el virus presente.

## CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	VII
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
III. REVISION DE LITERATURA	5
A. Definición de virus	5
B. Detección e identificación de virosis	5
C. Rango de hospederos	6
D. Transmisión experimental	7
1. Transmisión mecánica	8
E. Microscopía de luz	12
1. Inclusiones cristalinas	13
2. Inclusiones cilíndricas ramificadas	14
3. Colorantes usados para tinción de las inclusiones	15
4. Tejidos usados	17
F. Serología	17
1. Bases de las pruebas serológicas	17
2. El procedimiento ELISA	18
a. ELISA directo	19
b. ELISA indirecto	20
G. Principales virus que atacan a la arveja	22
1. Virus del mosaico amarillo del frijol (BYMV)	22
2. Virus mosaico de la arveja (PMV)	24

3.	Virus del amarillamiento de vena del trébol (CYVV)	27
4.	Virus mosaico de la arveja transmitido por semilla (PSbMV)	29
5.	Virus del mosaico y enaciones de la arveja (PEMV)	31
6.	Virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV)	32
7.	Virus mosaico del pepino (CMV)	34
IV.	HIPOTESIS Y OBJETIVOS	36
V.	METODOLOGIA	37
	A. Metodología de invernadero	37
	B. Metodología de campo	40
	C. Metodología de laboratorio	42
VI.	RESULTADOS	46
VII.	DISCUSION	69
VIII.	CONCLUSIONES	82
IX.	RECOMENDACIONES	84
X.	LITERATURA CITADA	86
	APENDICES	
	A. Metodología de invernadero	89
	B. Metodología de tinción para microcopia de luz	90
	C. Metodología para las pruebas de ELISA	91
	D. Muestreo en el campo	95
	E. Registro de muestras procesadas en el laboratorio	97
	F. Resultados brutos de las pruebas de ELISA	99

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro		Página
3.1	Reacciones a la tinción de los constituyentes de una célula huésped presentes en tejido sano y enfermo	16
Figura		
3.1	Superficie de hojas de <i>Nicotiana glutinosa</i> antes y después de la inoculación mecánica	9
3.2	Inoculación mecánica de virus	12
3.3	Cristales intracelulares en hoja de tabaco infectada con un potyvirus	14
3.4	Inclusiones cilíndricas en células de hojas de tabaco infectadas con Potato Virus Y	15
3.5	Esquema del método ELISA directo "doble sandwich"	20
3.6	Esquema del método ELISA indirecto con el antígeno adherido a la placa	21

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
6.1	Selección de plantas indicadoras adecuadas de acuerdo a la sintomatología presentada	46
6.2	Síntomas producidos por el virus BYMV inoculado. Marzo de 1993	48
6.3	Síntomas producidos por el virus BYMV inoculado. Agosto de 1993	49
6.4	Síntomas producidos por el virus CYVV inoculado. Marzo de 1993	50
6.5	Síntomas producidos por el virus CYVV inoculado. Agosto de 1993	51
6.6	Síntomas producidos por el virus CYVV inoculado. Diciembre de 1993	51
6.7	Síntomas producidos por el virus CYVV inoculado. Agosto de 1995	52
6.8	Síntomas producidos por el virus PMV inoculado. Agosto de 1993	53
6.9	Síntomas producidos por el virus PMV inoculado. Diciembre de 1993	54
6.10	Síntomas producidos por el virus PMV inoculado. Agosto de 1995	54
6.11	Plantas inoculadas con los virus PEMV y PSbMV (Lentil y Standard). Junio de 1994	55
6.12	Síntomas producidos por el virus PSbMV raza Standard inoculado. Agosto de 1995	56
6.13	Síntomas producidos por la muestra AS1293 inoculada. Junio de 1994	57
6.14	Síntomas producidos por la muestra ASV1293 inoculada. Junio de 1994	58
6.15	Síntomas producidos por la muestra BS1293 inoculada. Junio de 1994	58

6.16	Síntomas producidos por la muestra MS1194 inoculada. Julio y Agosto de 1995	59
6.17	Síntomas producidos por la muestra NS1194 inoculada. Julio y Agosto de 1995	60
6.18	Diferentes sintomatologías encontradas en el campo	61
6.19	Muestras de tejido coloreadas para observar cuerpos de inclusión	63
6.20	Prueba para detectar reacciones cruzadas entre los virus BYMV, CYVV, PSbMV y PMV. Febrero de 1996	66
6.21	Muestras con reacciones cruzadas ante los antisueros de BYMV, CYVV, PSbMV (policlonales) y PTY8 (monoclonal), utilizando la técnica de ELISA indirecto sin cobertura inicial	67

## I. INTRODUCCION

La arveja china (*Pisum sativum* L.) en Guatemala, ha sido durante los últimos 10 años una excelente alternativa económica para pequeños y medianos productores del altiplano central, a la vez que su comercialización en los mercados externos ha contribuido al ingreso de divisas para el país.

Uno de los problemas más serios en el cultivo, es la incidencia de plagas y enfermedades, lo cual ha obligado a los productores a implementar planes fitosanitarios basados generalmente en aplicaciones químicas constantes, sin que ello derive de estudios previos que apoyen o no la efectividad del control.

Se han desarrollado trabajos de investigación en el área fitosanitaria para determinar técnicas y métodos que sean efectivos para el control de plagas y enfermedades. Un ejemplo reciente, es el realizado conjuntamente por técnicos del ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas), el CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) y ARF (Agricultural Research Fund), denominado "Manejo Integrado de Plagas en Arveja China", llevado a cabo entre 1991 y 1993, y que con sus resultados proporcionó a los agricultores, capacitación en prácticas culturales, biológicas, físicas, y uso racional de pesticidas en el control de tales plagas y enfermedades.

Estos estudios han tenido resultados satisfactorios y han sido de mucha utilidad para los productores. Sin embargo, en virus, no se han hecho mayores estudios, y únicamente se señala la presencia de síntomas similares a los que producen estos patógenos en algunos campos de cultivo. Por otra parte se desconoce, cuál o cuáles son los virus que están afectando al cultivo, su transmisión, hospederos alternos, variedades tolerantes, susceptibles o resistentes, etc.

En este trabajo se pretende observar la sintomatología de las plantas sembradas en invernadero, inoculadas con virus en forma mecánica. La sintomatología característica será comparada con la observada en plantas de arveja china en su estado natural. También será preciso el empleo de técnicas de microscopía de luz y serología, para llegar a su caracterización. Finalmente, se pretende determinar la tolerancia y/o resistencia que presenten las variedades más usadas bajo condiciones de invernadero.

## II. ANTECEDENTES

El cultivo de arveja china (*Pisum sativum* L.) se inició en Guatemala hace más de 15 años. Este se ha extendido principalmente en el altiplano central del país (Chimaltenango 75% del área, Sacatepéquez 15% y Guatemala 10%). En 1991 se sembraron alrededor de 3000 hectáreas. La exportación fue de 14 millones de kilogramos, beneficiando al país con el ingreso de 22 millones de dólares en divisas (García et al, 1993).

De acuerdo a García (1992), para obtener un producto de calidad exportable, el agricultor establece planes fitosanitarios estrictos, basados en el uso de productos químicos en forma constante y sin evaluaciones previas. Como consecuencia, se han derivado problemas de resistencia a insecticidas, daños a los enemigos naturales y polinizadores, surgimiento de nuevas plagas, aumento de dosis de aplicación, utilización de plaguicidas sin registro para el cultivo, incremento de residuos tóxicos y retención de embarques de producto fresco, además de los daños al medio ambiente.

Una alternativa para la solución a estos problemas en el cultivo de arveja china lo constituye el manejo integrado de

plagas, cuyo enfoque se basa en el uso de diferentes métodos de control (García et al, 1993).

Aunque en Guatemala no se han realizado trabajos que permitan la identificación de los virus en arveja china, se han observado síntomas que indican la presencia de algunos de ellos, principalmente en el área de Patzicía, Tecpán y lugares cercanos. Los síntomas observados consisten en mosaicos que pueden ser ligeros o severos, clorosis intervenal, enanismo, y reducción del tamaño de hojas y entrenudos. El rendimiento y tamaño de vainas es menor (García, 1992 y Morales et al, 1993).

En campos vecinos a los de arveja se han observado otras leguminosas como frijol y haba, así como malezas del género *Lupinus*, infectadas por virus, las cuales podrían ser fuentes de inóculo para las plantas de arveja. También se han observado altas poblaciones de áfidos que podrían actuar como vectores (García, 1992 y Morales et al, 1993).

### III. REVISION DE LITERATURA

#### A. DEFINICION DE VIRUS:

Los virus son entes submicroscópicos formados por una o más moléculas de ácido nucléico, normalmente encajadas en una capa protectora de proteína o lipoproteína. Capaz de organizar su propia replicación únicamente dentro de células hospederas vivas.

Para que un agente pueda ser identificado positivamente como virus, debe ser transmisible y causar enfermedad por lo menos en un hospedero (Matthews, 1991).

De acuerdo a Luria y Darnell (1967), los virus son entidades cuyo genoma es un elemento de ácido nucléico, ADN o ARN, el cual se reproduce dentro de células vivientes y usa su maquinaria sintética para dirigir la síntesis de partículas especializadas, los viriones, que contienen el genoma viral y lo transfieren a otras células.

#### B. DETECCION E IDENTIFICACION DE VIROSIS:

La presencia de un virus en un organismo huésped, es reconocida por la ocurrencia de algunas manifestaciones anormales o síntomas, los cuales se dan tanto en medio natural como en condiciones controladas. Difícilmente se reconoce un virus

directamente con sólo la observación de las partículas de éste. Lo anterior se debe a que su estado extracelular es metabólicamente inerte. Esto es, que los virus no se multiplican ni llevan a cabo intercambios fuera de su ambiente en la célula. Todas sus actividades vitales se ejercen dentro de las células de sus hospederos y son reconocidos por síntomas de la planta (Luria y Darnell, 1967).

En el proceso de identificación, los postulados de Koch pueden aplicarse a la virología de la siguiente manera: (1) aislamiento del virus de plantas hospederas enfermas, (2) cultivo en hospederos experimentales o células huéspedes, (3) purificación (para excluir bacterias y otros patógenos grandes), (4) producción de síntomas similares en la misma especie hospedera original o en otras relacionadas, (5) reaislamiento del virus (Luria y Darnell, 1967).

### **C. RANGO DE HOSPEDEROS (Plantas indicadoras)**

El rango de hoperos de un virus, en términos generales, es un carácter fijo y relativamente estable, aunque algunas razas pueden variar en la severidad de los síntomas que producen en el huésped (Gibbs y Harrison, 1976).

Para Smith (1974), el hospedero alterno ideal, es aquel que reacciona rápida y típicamente a la inoculación, especialmente con la formación de lesiones locales sobre las hojas inoculadas. Estas plantas son llamadas "hospederos diferenciales" o "plantas indicadoras".

Según Matthews (1991), las plantas indicadoras proveen una de las herramientas básicas para el diagnóstico de rutina. Muchas especies indicadoras han sido encontradas en los géneros *Nicotiana*, *Solanum*, *Chenopodium*, *Cucumis*, *Phaseolus*, *Vicia* y *Brassica*.

Por medio de plantas indicadoras puede ser posible obtener mucha información sobre un virus desconocido. La primera necesidad es que el virus sea transmitido por savia; si no lo es, el vector debe ser indentificado y la sintomatología y rango de hospederos establecidos. Con un virus transmisible por savia puede obtenerse información sobre el rango de huéspedes, sintomatología y lesiones locales en el huésped (Smith, 1974).

#### **D. TRANSMISION EXPERIMENTAL:**

Para Matthews (1991), el conocimiento de las formas en las cuales los virus son transmitidos de planta a planta es importante por varias razones:

a. Desde el punto de vista experimental, podemos reconocer una enfermedad causada por un virus, solamente si podemos transmitir el virus a plantas sanas, y reproducir la enfermedad.

b. Los virus son económicamente importantes sólo si ellos pueden diseminarse de planta en planta rápidamente, en relación a la vida del cultivo en el campo.

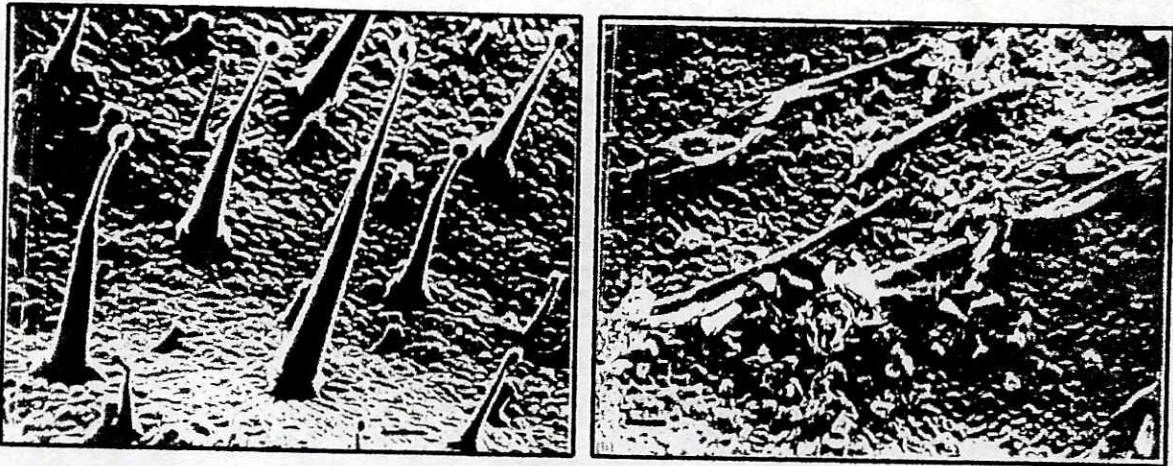
c. El conocimiento de las formas en que un virus se mantiene y disemina en el campo es usualmente esencial para el desarrollo de medidas de control satisfactorias.

#### 1. Transmisión mecánica

De acuerdo a Walkey (1985), la inoculación mecánica o transmisión por savia es usada para: aislar o purificar virus de plantas enfermas; transmitir virus a plantas huéspedes de prueba; estudiar los síntomas del virus en un rango de hospederos; y para hacer ensayos de la infectividad del virus.

La inoculación mecánica se basa en una serie de pasos que se inician provocando numerosas heridas pequeñas en la superficie de la hoja, sin causar muerte de las células, para que el virus penetre fácilmente a la planta huésped (Fig. III.1). El proceso se mejora empleando materiales abrasivos, los cuales dañan la cutícula y epidermis de la hoja permitiendo que la savia infectiva

entre en contacto con células sanas. La presión requerida sobre la hoja para inocular depende de la especie y edad de la planta, condición de la hoja, y aditivos presentes en el inóculo. Si en cierto tiempo aparecen áreas macroscópicas de tejido necrótico sobre las hojas inoculadas, es indicación que las heridas fueron excesivas (Matthews, 1991 y Walkey, 1985).



**Fig. III.1** Superficie de hojas de *Nicotiana glutinosa* (a) antes y (b) después de la inoculación mecánica (Walkey, 1985).

**a.** Preparación del inóculo:

El método consiste en triturar pequeñas porciones de hojas jóvenes en un mortero y su pistilo, agregando una pequeña cantidad

de solución amortiguadora. Generalmente se escogen las hojas que presentan síntomas de la enfermedad. El material macerado se coloca en una pieza de gasa, y la savia es extraída por presión con los dedos o el pistilo (Smith, 1974 y Walkey, 1985).

**b. Tratamiento químico del inóculo:**

Según Gibbs y Harrison (1976), la infectividad del inóculo es afectada por el tipo, cantidad y proporción de diferentes iones. Los fosfatos, especialmente de 0.02 a 0.1 M, en el rango de pH de 7.0 a 8.5, usualmente favorecen la infección. Sin embargo, las condiciones óptimas deben encontrarse para cada combinación de virus y huésped.

Al respecto, Walkey (1985) menciona que generalmente se usa una solución amortiguadora de Fosfato de Potasio 0.1 M. y un pH de 7.0 a 7.5. Si la savia de la planta infectada es particularmente ácida, la solución puede usarse a un pH de 8.0 a 8.5.

Para incrementar el número de heridas producidas por el inóculo se usan polvos abrasivos finos, como carborundum (carburo de sílice), corundum (óxido de aluminio) o Celite (suelo diatomáceo). Estos polvos pueden esparcirse sobre la superficie de las hojas del hospedero antes de la inoculación, o alternativamente el abrasivo puede mezclarse directamente con el inóculo (Walkey, 1985).

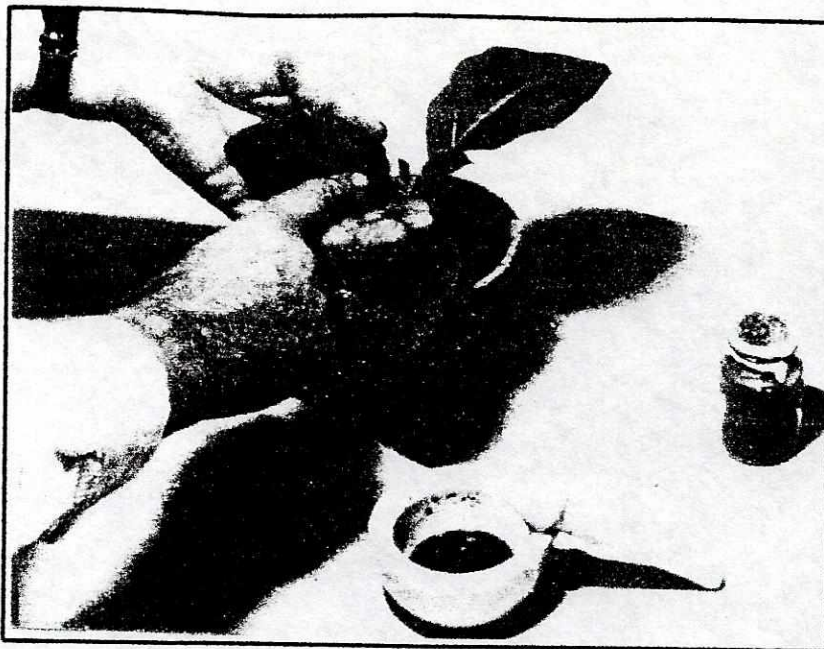
El efecto de los abrasivos depende del tamaño y la cantidad usadas, por ejemplo, carborundum a 500 o 600 mesh, da excelentes resultados cuando se aplica a las hojas o se mezcla con el inóculo de 50 a 100 mg/ml (Gibbs y Harrison, 1976).

**c. Tratamiento de las plantas antes y después de inocularlas:**

De acuerdo a Smith (1974) un factor ambiental muy importante es la intensidad de luz. De este modo, reduciendo la intensidad de la luz bajo la cual las plantas están creciendo en verano, se incrementa su susceptibilidad a la infección de ciertos virus.

Algunos trabajos sugieren que al exponer las plantas a altas temperaturas, antes de la inoculación, se incrementa la susceptibilidad a varios virus, aunque es claro que existe gran variedad de respuestas de las plantas bajo estas condiciones (Smith, 1974).

Matthews (1991) considera que lavando con agua las hojas inoculadas, inmediatamente después de la inoculación, se incrementa el número de lesiones locales formadas, y ésto se ha convertido en una práctica muy usada.



**Fig. III.2** Inoculación mecánica de virus (Gibbs y Harrison, 1976).

#### **E. MICROSCOPIA DE LUZ**

En cuanto a la histología de plantas infectadas pueden observarse varios cambios. Los síntomas internos más interesantes son las "inclusiones intracelulares". Estas ocurren sólo en plantas afectadas con virus, pero su ausencia no necesariamente significa que no hay virus presente (Smith, 1974).

Según Christie y Edwardson (1986), las inclusiones consisten en constituyentes alterados del huésped, agregados del virus, partículas agregadas de proteína de cobertura, y proteínas diferentes a las de cobertura; así como también mezclas entre

algunos de estos mismos componentes, y de éstos con constituyentes normales del virus.

Luria y Darnell (1967) exponen que la morfología y localización de las inclusiones depende del tipo de virus. Muchos producen solamente inclusiones intracitoplasmáticas, pero algunos virus de leguminosas producen inclusiones cristalinas en el núcleo de la célula y a veces en el nucleolo.

Existen varios tipos de inclusiones, entre las que se pueden mencionar:

**1. Inclusiones cristalinas:**

Las partículas de virus se acumulan en número suficiente, y en condiciones adecuadas forman arreglos cristalinos tridimensionales (Fig III.3). Se pueden formar cristales suficientemente grandes para ser vistos con microscopios de luz, o pueden permanecer tan pequeños que sólo pueden detectarse con microscopio electrónico (Matthews, 1991).



**Fig. III.3** Cristales intranucleares (X) en hoja de tabaco infectada con un potyvirus (Gibbs y Harrison, 1976).

## 2. Inclusiones cilíndricas:

Según Matthews (1991), los Potyvirus inducen la formación de inclusiones cilíndricas en el citoplasma de células infectadas. La característica más llamativa de éstas es la presencia de un tubo central, del cual se irradian "brazos" curvados que dan el efecto de espiral (Fig. III:4).

Se han observado inclusiones cristalinas intranucleares dentro de hojas de *Vicia faba* y *Phaseolus vulgaris* infectados con BYMV (Bean Yellow Mosaic Virus). El citoplasma también contiene inclusiones cristalinas similares (Smith, 1974).



**Fig. III.4** Inclusiones cilíndricas en células de hojas de tabaco infectadas con el Virus Y de la papa (Gibbs y Harrison, 1976).

### 3. Colorantes usados para tinción de las inclusiones:

Dos colorantes valiosos son: el **O-G** (orange-green), una combinación de los tintes Naranja Calcomin 2RS y Luxol Verde Brillante (Luxol brilliant green); y el **Azure A** (Christie y Edwardson, 1986).

Tanto la combinación O-G como el Azure A, tiñen ciertos constituyentes de la célula huésped presentes en tejido sano y enfermo, y los resultados son similares para todos los huéspedes (Cuadro III.1).

**Cuadro III.1** Reacciones a la tinción de los constituyentes de una célula huésped presentes en tejido sano o enfermo (Christie y Edwardson, 1986)

CONSTITUYENTE	COLORANTE	
	AZURE A	O-G
Cromatina	Azul	Verde
Nucleoplasma	Claro	Naranja
Nucleolo	Violeta-rojo	Verde
Pared celular	Incoloro	Verde-amarillo
Citoplasma	Incoloro	Verde-amarillo
Plastidios	Incoloro	Verde-amarillo
Microcristales	Incoloro	Verde
Proteína-P (floema)	Incoloro	Verde

La combinación **O-G** tiñe diferencialmente organelos de la planta e inclusiones que contienen proteína. La mayoría de las inclusiones que contienen proteína se tiñen verde, pero algunas lo hacen verde y naranja, resultando un color verde marrón. El colorante **Azure A** está diseñado para detectar inclusiones que contienen ácidos nucleicos. Las inclusiones virales con ácido ribonucleico (ARN) se tiñen rojo-violeta. Las inclusiones más pequeñas, menos densas, tienden a teñirse rosado-rojizo, mientras que inclusiones densas, particularmente los agregados de virus son más violeta (Christie y Edwardson, 1986).

Algunas veces es necesario agregar calor al teñir cristales, poniendo el tejido dentro del colorante a 60° C por 1-2 minutos hasta que los cristales se tiñan (Christie y Edwardson, 1986).

#### 4. Tejidos usados:

De acuerdo a Christie y Edwardson (1986) son usualmente los tejidos epidérmicos los más fáciles de obtener, y contienen numerosas inclusiones. Los "strips" epidermales se obtienen de muestras de tejido fresco o de muestras secas y quebradizas rehidratadas. Estos tejidos delgados se colorean fácilmente.

### **F. SEROLOGIA**

#### 1. Bases de las pruebas serológicas

##### a. Antígenos:

Según Hampton et al (1990), un antígeno es una sustancia, usualmente una proteína o un polisacárido, capaz de estimular la producción de anticuerpos específicos, y capaz de combinarse con las moléculas de estos anticuerpos que se producen.

Las moléculas grandes son usualmente inmunógenos más efectivos que las pequeñas. Los virus de plantas contienen macromoléculas de proteína, siendo muy efectivos para estimular la producción de anticuerpos específicos (Luria y Darnell, 1967; Matthews, 1991).

##### b. Anticuerpos:

Un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina, generalmente la gammaglobulina (IgG), que es producida por los

linfocitos B de un animal en respuesta a un estímulo antigénico. Estas proteínas circulan en el torrente sanguíneo y son capaces de combinarse y reaccionar específicamente con el antígeno que estimuló su producción (homólogo) (Gibbs y Harrison, 1976; Hampton et al, 1990; Luria y Darnell, 1967).

Un suero que contiene anticuerpos es llamado antisuero. La reacción entre un antisuero y el antígeno homólogo puede estudiarse fácilmente in vitro de muchas maneras, conformando ésto la base de las pruebas serológicas (Gibbs y Harrison, 1976; Luria y Darnell, 1967; Smith, 1974).

## 2. El procedimiento ELISA

En 1977 se demostró que el método de placas de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays) podría ser muy eficaz aplicado a la detección y estimación cuantitativa de un gran número de virus en plantas. Desde ese momento, el método ha sido usado más ampliamente. Se han descrito muchas variaciones del procedimiento básico con el objetivo de optimizar las pruebas para propósitos en particular (Hampton et al, 1990 y Matthews, 1991).

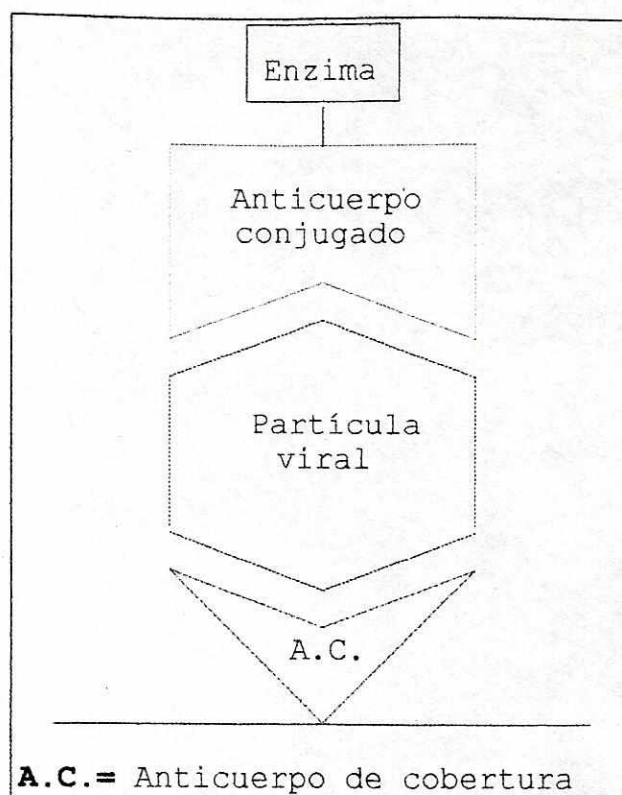
Según Hampton et al (1990), la prueba de ELISA detecta solamente el antígeno viral, pero no mide su infectividad. Se

necesitan entonces, ensayos biológicos para determinar si una muestra positiva a la prueba es infectiva.

En la última década, varios tipos de ELISA se han convertido en las pruebas serológicas preferidas para detectar virus en plantas, debido a su simplicidad, adaptabilidad, rapidez, sensibilidad y precisión (Hampton et al, 1990).

**a. ELISA Directo:**

Si una enzima es eslabonada covalentemente a la inmunoglobulina antiviral, la prueba es clasificada como ELISA **Directo**. Este es el método descrito en 1977, y ha sido usado muy ampliamente pero sufre dos limitaciones. (i) Puede ser muy específico para una raza. Esta característica puede ser muy útil para hacer discriminaciones entre razas de virus. Sin embargo, para diagnósticos de rutina, significa que diferentes serotipos pueden escapar a la detección; (ii) requiere un diferente complejo enzima-anticuerpo para cada virus que se estudia (Hampton et al, 1990 y Matthews, 1991).

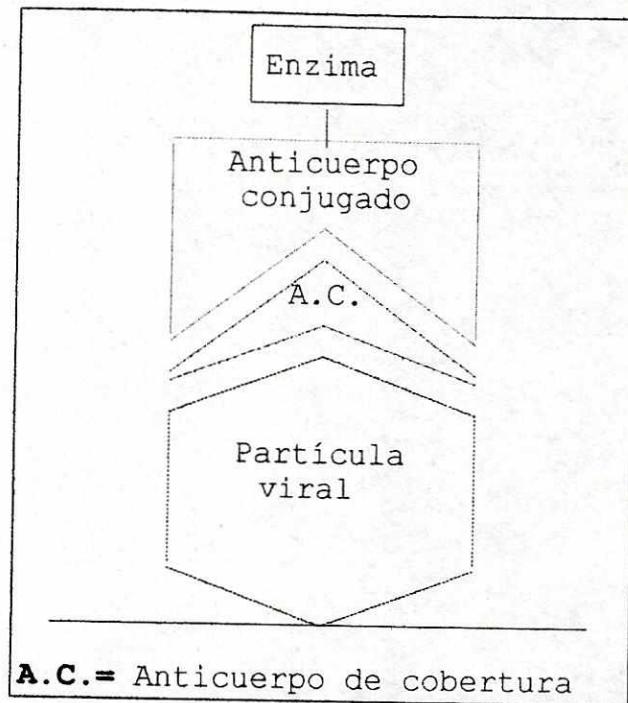


**Fig. III.5** Esquema del método ELISA directo "doble sandwich".

**b.** ELISA Indirecto

Cuando la enzima es eslabonada a una molécula (antiglobulina) que detecta la inmunoglobulina antiviral, la prueba es clasificada como ELISA **Indirecto**. Por ejemplo, si los anticuerpos del virus fueron desarrollados en conejos, debe usarse una antiglobulina producida en otro animal. Además, los métodos indirectos detectan un rango más amplio de virus relacionados con un simple antisuero (Hampton *et al*, 1990 y Matthews, 1991).

El método ELISA detecta la formación de complejos anticuerpo-antígeno por el rápido desarrollo enzimático de un producto coloreado. Esto se lleva a cabo con adiciones sucesivas de reactivos que culminan en la hidrólisis enzimática del sustrato de la enzima, convirtiendo una sustancia incolora en un pigmento (Hampton *et al*, 1990).



**Fig. III.6** Esquema del método ELISA indirecto con el antígeno adherido a la placa.

## G. PRINCIPALES VIRUS QUE ATACAN A LA ARVEJA

### 1. VIRUS DEL MOSAICO AMARILLO DEL FRIJOL

BEAN YELLOW MOSAIC VIRUS (BYMV)

#### a. Descripción:

Es un Potyvirus cuyas partículas elongadas y filamentosas miden aproximadamente 750 nm de largo y 15 nm de ancho. El punto de inactivación térmica (10 minutos) es usualmente de 55-60°C, variando entre 50 y 70°C. La longevidad *in vitro* normalmente es de 1-2 días, pero algunas veces más de 7 días. El punto final de dilución es 1:800 a 1:1000 (Bos, 1970).

#### b. Transmisión:

Según Smith (1972), el virus es mecánicamente transmisible.

De acuerdo a Bos (1970), más de 20 especies de áfidos pueden transmitirlo de manera no persistente, especialmente el de la arveja (*Acyrtosiphum pisum* Harris), el del frijol (*Aphis fabae* Scop.), *Megoura viciae* Buckt., *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus persicae* Sulz.

La transmisión por semilla no es común, pero puede ocurrir en bajo porcentaje en arveja, haba y trébol (3-6%).

c. Rango de hospederos y sintomatología:

i. *Phaseolus vulgaris* (frijol). Ocurre epinastía en las hojas primarias inoculadas, y aparecen lesiones locales cloróticas o necróticas algunas veces extendidas hacia las venas. Las hojas muestran un mosaico amarillo sistémico y están malformadas, y las vainas algunas veces se ven moteadas o malformadas, pudiendo ocurrir necrosis en la parte alta de la planta (Bos, 1970).

Según Smith (1972), las plantas se achaparran por el acortamiento de entrenudos y la proliferación de ramas, la madurez es retrasada, y la producción de vainas se reduce en gran medida.

Según Bos (1970), los síntomas dependen de la variedad del huésped y la raza del virus.

ii. *Pisum sativum* (arveja). En ciertas variedades el BYMV produce patrones típicos de mosaico. Este mosaico es más débil que el provocado por el PEMV (Pea Enation Mosaic Virus) y el PMV (Pea Mosaic Virus). Los primeros síntomas consisten en un moteado débil, que se torna más intenso, luego un pronunciado aclareo de venas en donde la región entrevenas permanece verde, pero más claro que lo normal. Las hojas y estípulas son más pequeñas que las normales y las plantas infectadas presentan deformación. Cuando la deformación es grande, pueden presentarse vainas malformadas y en algunos casos reducidas en tamaño (Smith, 1972).

**iii.** *Vicia faba* (haba). Se desarrolla una clorosis suave con una pequeña malformación de las hojas y la planta se atrofia. Una característica es la presencia de inclusiones cristalinas en el núcleo, el citoplasma y las células guardianas de los estomas en partes de las plantas con síntomas visibles (Smith, 1972).

Según Bos (1970), otros hospederos para diagnóstico son: *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Nicotiana tabacum*, *Spinacia oleracea*.

**d.** Histopatología:

En tejidos epidérmicos se pueden observar inclusiones citoplasmáticas cristalinas y/o granulares, y algunas veces cristalinas intranucleares (Bos, 1970).

**2.** VIRUS MOSAICO DE LA ARVEJA

PEA MOSAIC VIRUS (PMV)

**a.** Descripción:

Las partículas de este Potyvirus son largas y filamentosas. El punto de inactivación térmica es de 60-64°C (10 minutos); la longevidad *in vitro* de 48 a 72 horas; y el punto final de dilución cerca de 1:5000 (Smith, 1972).

**b. Transmisión:**

Según Smith (1972), puede ser transmitido mecánicamente, y por los áfidos vectores *Acyrtosiphon pisi*, *Myzus persicae*, *Aphis fabae* y *A. rumicis*. Los áfidos adquieren el virus, y lo transmiten, luego de períodos de alimentación de cinco minutos. No se ha reportado transmisión por semilla.

**c. Rango de hospederos y sintomatología:**

El virus no es transmisible a *Phaseolus vulgaris*, aunque algunos estudios han demostrado que puede transmitirse a algunos frijoles enanos.

En otros estudios realizados no se logró ninguna infección con PMV en plantas que no fueran leguminosas. Trescientas treinta plantas leguminosas de 9 géneros, 28 especies y 32 variedades fueron encontradas susceptibles al virus (Hagedorn y Walker, 1954; Smith, 1972).

**i. *Pisum sativum* L. (arveja).** Los síntomas varían según la edad del huésped y las condiciones ambientales, siendo más severos en la porción superior de la planta. Inicialmente ocurre un aclareo de venas en hojas nuevas, luego la característica es una clorosis o amarillamiento severo de las hojas, con numerosas áreas

verde oscuro dispersas sobre ella. Un síntoma característico y típico es una atrofia general de la planta (Smith, 1972).

**ii.** *Vicia faba* (haba). Las hojas muestran un amarillamiento brillante y moteado verde. Ocasionalmente las hojas afectadas son anormalmente angostas y alargadas. Los cambios histológicos en las hojas primarias pueden reconocerse porque tienen células empalizadas y esponjosas no diferenciadas, y las zonas enfermas son más delgadas que las normales (Smith, 1972).

El hecho de que los síntomas de mosaico en arveja puedan ser causados por varias razas de virus, ha dado como resultado varios nombres de enfermedades y mucha confusión. Los síntomas dependen de las razas de virus y las variedades de plantas involucradas. Por mucho tiempo el virus mosaico de la arveja (PMV), se consideró un virus separado del mosaico amarillo del frijol (BYMV), pero según Bos (1970) y Sherf y Macnab (1986) ahora ya no lo es.

Zitter y Provvidenti (1984) también incluyen razas de mosaico amarillo de la arveja (PMV) dentro del BYMV.

**d. Histopatología:**

Según Smith (1972), se pueden observar tres tipos de cuerpos de inclusión: cristales romboédricos localizados en el

citoplasma; *bandas* de 25-75 nm de ancho y más de 3.5  $\mu$  de largo; y *partículas de virus* usualmente agregadas alrededor de las *bandas*. Es menos común observar inclusiones nucleares.

**3. VIRUS DEL AMARILLAMIENTO DE VENA DEL TREBOL**  
CLOVER YELLOW VEIN VIRUS (CYVV)

**a. Descripción:**

Pertenece al grupo de los Potyvirus, y tiene partículas largas y filamentosas entre 700-800 nm de largo. El punto de inactivación térmica (10 minutos) es de 55°C; la longevidad *in vitro* a 18°C de 8 días; y el punto final de dilución 1:10000 (Smith, 1972)

**b. Transmisión:**

Según Smith (1972), este virus es mecánicamente transmisible. No existe evidencia de transmisión por semilla. Es transmitido en forma no persistente, por los áfidos *Myzus persicae* y *Acyrtosiphon pisum*, pero no por *Aphis fabae*.

**c. Rango de hospederos y sintomatología:**

**i.** *Phaseolus vulgaris* L. (frijol). A veces aparecen manchas cloróticas en las hojas inoculadas, pero regularmente los primeros

#### 4. VIRUS MOSAICO DE LA ARVEJA TRANSMITIDO POR SEMILLA

##### PEA SEED-BORNE MOSAIC VIRUS (PSbMV)

###### a. Descripción:

Pertenece al grupo de los Potyvirus, se ha determinado una longevidad *in vitro* de 24 horas a temperatura ambiente; el punto de inactivación térmica (10 minutos) es de 55°C; y el punto final de dilución 1:1000 (Hampton y Mink, 1975).

###### b. Transmisión:

De acuerdo a Hampton y Mink (1975), el virus es transmisible por inoculación mecánica y de manera no persistente por los áfidos *Acyrtosiphon pisum*, *Dactynotus escalanti*, *Macrosiphum euphorbiae*, *M. rosae*, *Myzus persicae*, *Ovatus crataegarius*, *Rhopalosiphum padi*, *Aphis craccivora* y *A. fabae*, y no por el *Periphyllus lyropticus*. Transmitido en más del 30% por semillas de plantas infectadas previo a la floración, pero no por semilla de plantas infectadas después que la floración inicia. Han sido encontrados lotes de semillas comerciales conteniendo arriba de 90% de semillas infectadas. Menos de 1% de las semillas se infectan como resultado de la polinización con polen de plantas enfermas.

**c. Rango de hospederos y sintomatología:**

La arveja es el principal huésped natural, pero el virus puede infectar 47 especies en 12 familias de dicotiledóneas. Muchos de los hospederos que no son leguminosas, son infectados sin la producción de síntomas (Hampton y Mink, 1975).

**i. *Pisum sativum* L. (arveja).** Ocurre un aclareo de venas y mosaico en hojas jóvenes, también un acortamiento de entrenudos, usualmente formando una roseta terminal. Los síntomas pueden confundirse con desórdenes genéticos o fisiológicos. Las plantas infectadas tempranamente o que salieron de semillas infectadas, no producen flores, o unas pocas distorsionadas, al igual que las vainas (Sherf y Macnab, 1986).

**ii. *Vicia faba* (haba).** Se produce un moteado sistémico zonal verde oscuro y claro. Ocurre enrollamiento y distorsiones en la forma de las hojas (Hampton y Mink, 1975).

**d. Histopatología:**

El virus produce inclusiones cilíndricas ramificadas en el citoplasma de células del mesófilo de arveja y haba (Hampton y Mink, 1975).

## 5. VIRUS DEL MOSAICO Y ENACIONES DE LA ARVEJA

### PEA ENATION MOSAIC VIRUS (PEMV)

Es uno de los virus más distintivos porque produce aristas peculiares parecidas a ampollas (enaciones) sobre la parte inferior de las hojas infectadas. Ningún otro virus que ataca a la arveja produce síntomas de este tipo (Hagedorn y Walker, 1954).

#### a. Descripción:

Se han determinado valores de inactivación térmica cerca de los 65°C, y longevidad *in vitro* de 4 días a 20°C. Las partículas son isométricas de 28 nm de diámetro (Peters, 1982).

#### b. Transmisión:

Según Peters (1982), el virus es transmitido fácilmente por inoculación mecánica, y de una forma circulatoria por al menos siete especies de áfidos, siendo el más eficiente vector en el campo el *Acyrtosiphon pisum*. La transmisión por semilla en arveja tiene valores bajos de 1.5% aproximadamente.

#### c. Rango de hospederos y sintomatología:

Luego de algunos estudios, el rango de hospederos fue limitado a las siguientes leguminosas: soya, haba, arveja, trébol dulce amarillo y trébol púrpura (Hagedorn y Walker, 1954).

i. *Pisum sativum* L. (arveja). Se produce un aclareo de venas en las hojas jóvenes a los 6 a 8 días después de la inoculación, luego aparecen puntos cloróticos, manchas hialinas y translúcidas en las hojas, y más tarde, patrones de mosaicos y enrollamiento hacia arriba de las hojas jóvenes. Las plantas infectadas crónicamente, muestran un aclareo de venas o mosaico, y usualmente desarrollan enaciones en la parte inferior de las hojas superiores de la planta (Peters, 1982).

Las vainas pueden reducirse en tamaño y desarrollar un retorcimiento moderado o severo. Las enaciones típicas son también formadas en estas vainas (Hagedorn y Walker, 1954).

**d. Histopatología:**

Según Peters (1982) no se detectan cuerpos de inclusión.

**6. VIRUS DE LA MARCHITEZ MANCHADA DEL TOMATE**

**TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV)**

**a. Descripción:**

Las partículas del virus son isométricas y de un diámetro de 70-90 nm, aparentemente protegidas por una membrana. Física y químicamente es uno de los virus más inestables, teniendo un punto de inactivación térmica (10 minutos) de 40-46°C, su longevidad in

Cuando la infección se da sobre plantas jóvenes, la cosecha entera se pierde, pero en plantas viejas, sólo las vainas tardías son afectadas (Sherf y Macnab, 1986).

## 7. VIRUS MOSAICO DEL PEPINO

### CUCUMBER MOSAIC VIRUS (CMV)

#### a. Descripción:

Pertenece al grupo de los Cucumovirus, tiene partículas isométricas de 28-30 nm de diámetro. El virus es relativamente inestable en extractos de plantas, no soporta temperaturas arriba de los 70°C por 10 minutos, y su infectividad, a temperatura ambiente, se pierde en pocos días o a veces horas (Francki et al, 1979).

#### b. Transmisión:

Según Francki et al (1979), el virus es transmisible por inoculación con savia, y de forma no persistente por más de 60 especies de áfidos cuya eficiencia varía según la especie del áfido y la planta huésped. Ocurre transmisión por semilla en varias especies de plantas incluyendo algunas malezas.

**c. Rango de hospederos y sintomatología:**

El virus tiene un rango de hospederos extremadamente amplio. Algunos estudios han reportado 191 especies susceptibles en 40 familias, y se han infectado plantas en 39 familias con la raza común japonesa (Francki et al, 1979).

El síntoma más común incitado por CMV es mosaico, sin embargo, la severidad de la enfermedad puede ir de síntomas no obvios en algunos cultivos, hasta la muerte del hospedero (Kurstak, 1981).

**i. *Pisum sativum* L. (arveja).** Los síntomas más obvios son clorosis y atrofia general de la planta, y malformación de las hojas. Las plantas enfermas generalmente se marchitan y mueren prematuramente (Hagedorn y Walker, 1954).

Otros hospederos pueden ser *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Lycopersicum esculentum*, *Nicotiana tabacum*.

**d. Histopatología:**

Algunas veces se pueden detectar agregados cristalinos del virus, usualmente en las vacuolas (Francki et al, 1979).

#### IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Se considera como HIPOTESIS nula ( $H_0$ ):

"NO HAY PRESENCIA DE VIRUS EN LOS CAMPOS DE CULTIVO DE ARVEJA CHINA EN EL ALTIPLANO CENTRAL DE GUATEMALA".

Los objetivos del trabajo son los siguientes:

##### a. GENERAL

Desarrollar información básica que ayude a conocer la importancia que tienen las enfermedades virales en las plantaciones de arveja china del altiplano central de Guatemala.

##### b. ESPECIFICOS

i. Caracterizar los virus que afectan al cultivo de la arveja china, partiendo de muestras tomadas en las principales áreas de producción del país.

ii. Identificar fuentes de resistencia, cuyo germoplasma podría ser utilizado como alternativa para introducción de nuevas variedades y/o para desarrollar programas de mejoramiento en el país.

## V. METODOLOGIA

El estudio comprendió tres áreas de trabajo: invernadero, campo y laboratorio.

### A. METODOLOGÍA DE INVERNADERO

Se utilizó un invernadero de madera de 12.5 m<sup>2</sup>, localizado en el campus de la Universidad del Valle de Guatemala.

El trabajo en el invernadero se dividió en 2 fases:

En la **Fase I** se hizo la inoculación y generación de sintomatología utilizando los virus que se tenían aislados; siendo éstos: Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV); Clover Yellow Vein Virus (CYVV); Pea Mosaic Virus (PMV); Pea Enation Mosaic Virus (PEMV); Pea Seed-Borne Mosaic Virus (PSbMV).

La **Fase II** se inició luego de los primeros muestreos en el campo. Sobre las plantas indicadoras seleccionadas en la fase I, se inocularon muestras de campo con sintomatología de virosis, éstas fueron: AS1293, ASV1293, BS1293, MS1194 y NS1194 (Ver descripción de las muestras en apéndices D y E, tablas D.1 y E.1).

Para llevar a cabo estas dos fases fue necesario seguir el procedimiento que se detalla a continuación.

### 1. Germinación de semillas:

Las semillas de plantas indicadoras se germinaron en cajas de petrí estériles con papel absorbente húmedo.

Se utilizaron un total de 25 plantas de diferentes especies y variedades (Apéndice A, Cuadro A.1).

### 2. Siembra de las semillas germinadas:

Se sembraron en macetas plásticas lavadas y desinfectadas con una solución de cloro. Se usó una mezcla de tierra y arena en proporción 3:1, esterilizada en autoclave y desinfectada con fungicidas. Se colocaron 2 a 3 semillas por maceta.

### 3. Manejo de las plantas:

Se registraron diariamente las temperaturas mínimas y máximas dentro del invernadero, regulando la ventilación abriendo o cerrando las ventanas laterales.

Las plantas se regaron 2 o 3 veces por semana, se aplicaron pesticidas en dosis adecuadas para el control de insectos y enfermedades, y se hizo un control manual de malezas dentro y fuera del invernadero.

#### 4. Inoculación mecánica del virus:

Antes de inocular se colocaron tutores delgados de bambú en cada maceta.

El tejido infectado se reactivó triturándolo en un mortero de porcelana, previa adición de una solución amortiguadora de  $K_2HPO_4$  0.05 M ajustado a un pH 8.8 (Apéndice A, Sección II).

La relación peso de la muestra y volumen del amortiguador dependió de la cantidad de plantas por inocular y la concentración que se deseaba darle al inóculo. Usualmente fue de 1:20.

El tiempo de hidratación del tejido antes de inocularlo fue de 15 a 30 minutos.

Las plantas se inocularon al tener desarrollados uno o dos pares de hojas verdaderas.

El abrasivo (arena blanca cernida) se dispersó sobre las hojas, y sin hacer demasiada presión, se aplicó el inóculo usando el pistilo del mortero o el dedo índice, dependiendo de la menor o mayor sensibilidad de la hoja. Finalmente las hojas se lavaron.

En algunos casos se hizo una segunda inoculación 5 a 10 días después de la primera, sobre las hojas nuevas.

Las observaciones diarias permitieron anotar cualquier anomalía como: amarillamiento, clorosis, necrosis o

arrugamiento de las hojas; reducción de tamaño o muerte prematura de la planta; número de días al aparecimiento de síntomas, etc.

Se recolectaron y almacenaron las semillas de las plantas inoculadas (con o sin síntomas). También se recolectó tejido para el trabajo de microscopía de luz y las pruebas serológicas.

La sintomatología obtenida en las fases I y II del invernadero fue comparada con la que se observó en el campo. Estas comparaciones, apoyadas con las descritas en la literatura, sirvieron para tener una idea inicial del posible o posibles virus involucrados.

## **B. METODOLOGÍA DE CAMPO**

El trabajo de campo consistió en la selección de plantaciones apropiadas para el muestreo y la recolección del material vegetal necesario para trabajar en las fases de invernadero y laboratorio.

Los muestreos se realizaron especialmente en regiones de los departamentos de Chimaltenango y Sacatepéquez. La tabla D.1 del Apéndice D describe detalladamente cada uno de ellos.

### **1. Selección del área de muestreo:**

Se buscaron plantaciones en estado de crecimiento avanzado, con 45 o 60 días después de la siembra, en inicio de floración.

Se muestrearon lugares con diferente manejo y algunas veces opuestos entre sí, por ejemplo; plantaciones con mal manejo de tutores, poco control de plagas y enfermedades, poco control de malezas, etc., o bien manejadas; con riego o sin él; distintas variedades de arveja; cultivos vecinos; cultivo anterior; etc.

Se tuvo el apoyo de algunas cooperativas de arvejeros y técnicos de la Gremial de Exportadores de Productos No Tradicionales que prestan asesoría, para el acceso a campos de cultivo de mayor control.

## 2. Sistema de muestreo:

En cada plantación seleccionada se realizó un muestreo al azar. Utilizando cuchillas o tijeras desinfectadas con una solución de cloro se recolectó tejido joven de la planta, principalmente hojas.

El tejido se colocó dentro de bolsas plásticas debidamente identificadas, separando las muestras con síntomas y sin ellos. Todas las muestras se transportaron en una hielera.

La cantidad de plantas muestreadas y de tejido colectado dependió del tamaño de la plantación y la presencia de síntomas.

Para cada lugar muestreado se anotó: localidad, condiciones ambientales, condiciones del cultivo (fenología, fertilización,

riego, etc.), variedad, plagas observadas, posibles hospederos alternos, cultivos anteriores.

### **C. METODOLOGÍA DE LABORATORIO**

Con los resultados preliminares de invernadero y campo, y con las muestras obtenidas en estos dos ambientes, se corroboró en el laboratorio la presencia de virus mediante pruebas serológicas y la microscopía de luz.

#### **1. Procesamiento de las muestras:**

Las muestras procedentes del campo e invernadero se seccionaron con cuchillas desinfectadas, se empacaron y deshidrataron con material desecante (Silica gel) a 4°C.

Se tomaron muestras de epidermis del envés de la hoja para emplearlas en los estudios de microscopía de luz.

#### **2. Microscopía de luz:**

Este proceso se realizó para localizar y observar cuerpos de inclusión, en muestras del campo y de plantas indicadoras de la fase I y II del invernadero. Se usaron plantas sanas y con síntomas aparentes.

**a. Obtención del tejido:**

Utilizando el envés de hojas jóvenes, se obtuvieron, con la ayuda de pinzas de punta fina, pequeñas tiras (strips) del tejido epidérmico de la hoja, y se preservaron en etilenglicol monometil éter (metilcellosolve).

**b. Procedimiento de tinción:**

Las muestras fueron teñidas usando las técnicas de coloración con Orange-Green y Azure A (Apéndice B).

**c. Observación en el microscopio:**

Los montajes se observaron en microscopio de luz, comparando células de plantas enfermas y sanas. Se determinó la presencia o no de inclusiones, y el estado general de la célula y de los organelos visibles. Se tomaron fotografías de las muestras más importantes.

**3. Técnica de ELISA:**

Se dispuso de antisueros policlonales para los virus BYMV (Bean Yellow Mosaic Virus), CYVV (Clover Yellow Vein Virus), PSbMV (Pea Seed-borne Mosaic Virus), TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus) y CMV (Cucumber Mosaic Virus), también un monoclonal para Potyvirus

(PTY 8). Cada uno de éstos con su respectivo anticuerpo conjugado (Apéndice C, Sección I)

La forma de preparación de los amortiguadores y las soluciones usadas se describe en el Apéndice C, Sección II.

**a. Preparación de las muestras:**

Las muestras deshidratadas se trituraron con una solución extractora (de maceración) en proporción 1:20 (peso muestra: volumen de solución). Para las pruebas con TSWV y CMV se usaron 0.2 g/4 ml; para las de PSbMV y CYVV, 0.1 g/2 ml; y para las de BYMV y PTY8, 0.05 g/1 ml.

**b. Procedimiento:**

Para los virus TSWV y CMV, se utilizó la técnica de ELISA Directo (Doble Sandwich); y para BYMV, PSbMV, CYVV y el Monoclonal (PTY8) el ELISA Indirecto sin cobertura inicial (Ver procedimientos detallados en Apéndice C, Secciones III y IV).

**c. Análisis de resultados:**

Para cada placa se calculó un punto de corte que fuera lo suficientemente alto para eliminar los falsos positivos. Esto se hizo tomando el valor estadístico de Student con 99.99% de confiabilidad e infinitos grados de libertad ( $t=2.576$ ), el cual se

incorpora en la fórmula  $A + ts$ , en donde  $A$  representa el valor promedio de las absorbancias de los controles negativos de cada placa a 405 nm, y  $s$  es el valor de la desviación estándar de estas absorbancias. Los valores por debajo del punto de corte fueron considerados como negativos y los que estaban por arriba como positivos.

**A. INVERNADERO**

FASE I: SELECCION DE PLANTAS INDICADORAS Y GENERACION DE SINTOMATOLOGIA CON VIRUS CONOCIDOS.

Al final de esta fase del proyecto se eliminaron 10 plantas debido a que no presentaron síntomas claros y definidos cuando fueron inoculadas.

Las plantas restantes de las 25 iniciales, sí mostraron características adecuadas, y en consecuencia, fueron utilizadas para el desarrollo de las siguientes fases del proyecto (Tabla VI.1).

**TABLA VI.1.** Selección de plantas indicadoras adecuadas de acuerdo a la sintomatología presentada.

No.	Planta	No. veces inoculada	Calificación
1	Arveja Oregon Sugar Pod II <sup>a</sup>	2	Adecuada <sup>b</sup>
2	Arveja Kawana	2	No adecuada
3	Arveja Melting Sugar <sup>a</sup>	2	Adecuada <sup>b</sup>
4	Arveja Snow Flake	14	Adecuada <sup>c</sup>
5	Arveja Oregon Sugar Pod II <sup>e</sup>	2	Adecuada <sup>b</sup>
6	Arveja Ranger <sup>d</sup>	0	-----
7	Arveja Oregon Sugar Pod	2	Adecuada <sup>b</sup>
8	Arveja Bonneville <sup>d</sup>	0	-----
9	Arveja Perfected Freezer 60	10	Adecuada <sup>c</sup>
10	Arveja Oregon Giant	2	No adecuada
11	Arveja Taichung No. 13	2	No adecuada
12	Arveja 663 Taichung No. 11	2	No adecuada
13	Frijol Black Turtle 2	10	Adecuada <sup>b</sup>
14	Frijol Black Turtle 1	10	Adecuada <sup>b</sup>
15	Frijol California Light Red Kidney	10	Adecuada <sup>b</sup>

No.	Planta	No. veces inoculada	Calificación
16	Pepino Marketmore 70	2	No adecuada
17	Zucchini Seneca zucchini	2	No adecuada
18	Arveja Melting Sugar <sup>f</sup>	12	Adecuada <sup>b</sup>
19	Arveja Oregon Sugar Pod II <sup>f</sup>	12	Adecuada <sup>b</sup>
20	Frijol Tamazulapa	12	Adecuada <sup>b</sup>
21	Trébol Rojo	3	No adecuada
22	Haba Toluca Mex	8	Adecuada <sup>b</sup>
23	Haba ICTA Blanquita	8	Adecuada <sup>b</sup>
24	Tomate Roma <sup>g</sup>	0	-----
25	Frijol Ostúa	12	Adecuada <sup>b</sup>

**Notas:**

<sup>a</sup> Semilla adquirida en Guatemala.

<sup>b</sup> Plantas adecuadas por su susceptibilidad a diferentes virus. No todas son susceptibles a los mismos virus, pero todas muestran síntomas claros cuando se infectan.

<sup>c</sup> Plantas adecuadas por su resistencia. Las dos variedades resultaron ser resistentes a la mayoría de virus que se inocularon.

<sup>d</sup> No se logró germinación por presencia de hongo en la semilla.

<sup>e</sup> Semilla adquirida en Oregon State University.

<sup>f</sup> Semilla nueva adquirida en Guatemala.

<sup>g</sup> No se utilizó por limitación de espacio en invernadero.

El virus BYMV (Bean Yellow Mosaic Virus) se inoculó primero en 15 plantas (números del 1 al 17, exceptuando la 6 y 8). Se usaron semillas de Guatemala y algunas de Estados Unidos que presentaron buenos resultados en pruebas realizadas por investigadores de aquel país. No se hizo reinoculación. Los resultados están descritos en la Tabla VI.2.

**TABLA VI.2.** Síntomas producidos por el virus BYMV inoculado. Guatemala, marzo 1993.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
26-3-93	1	Arveja Oregon Sugar Pod II	Mosaico hojas jóvenes, luego más evidente	6
26-3-93	2	Arveja Kawana	No presentó síntomas	
23-3-93	3	Arveja Melting Sugar	Mosaico hojas jóvenes. Borde hojas levemente volteado hacia arriba	9
26-3-93	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
26-3-93	5	Arveja Oregon Sugar Pod II	Mosaico aparente en hojas inferiores	19
26-3-93	7	Arveja Oregon Sugar Pod	Mosaico en hojas de edad mediana. Con el tiempo más evidente	19
26-3-93	9	Arv. Perf. F.60	No presentó síntomas	
26-3-93	10	Arv. Oregon Giant	No presentó síntomas	
23-3-93	11	Arv. Taichung No. 13	Aparente mosaico. Con el tiempo desapareció	7
23-3-93	12	Arv. Taichung No. 11	Síntomas no claros	
23-3-93	13	Frijol Black Turtle 2	Marchitez y epinastía. Hojas jóvenes débiles, con mosaico.	6
23-3-93	14	Frijol Black Turtle 1	Mosaico hojas jóvenes epinastía de hojas	9
23-3-93	15	Frijol California Light Red Kidney	Mosaico en hojas jóvenes bien marcado. Aclareo de venas	7
23-3-93	16	Pepino Marketmore70	No hubo síntomas claros	
23-3-93	17	Zucchini Seneca	No hubo síntomas claros	

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición; Arv.=Arveja; Perf. F.60=Perfected Freezer 60.

Se adquirieron 8 semillas más (números del 18 al 25). Estas nuevas plantas, más las que en la primera inoculación se consideraron adecuadas, se inocularon nuevamente con el BYMV. Se hizo una reinoculación (el 30/8/93) excepto a las habas.

En total se utilizaron 12 plantas. Los resultados se presentan en la Tabla VI.3. 49

**TABLA VI.3.** Síntomas producidos por el virus BYMV inoculado. Guatemala, agosto de 1993.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
22-8-93	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
22-8-93	9	Arveja Perfected Freezer 60	No presentó síntomas	
22-8-93	13	Frijol Black Turtle 2	Mosaico, reducción tamaño y deformación en hojas jóvenes.	19
22-8-93	14	Frijol Black Turtle 1	Mosaico, reducción tamaño y deformación en hojas jóvenes.	20
22-8-93	15	Frijol California Light Red Kidney	Mosaico suave en hojas jóvenes.	20
22-8-93	18	Arveja Melting Sugar	Mosaico bien marcado y distribuido en toda la planta	18
22-8-93	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	Mosaico en hojas jóvenes	15
22-8-93	20	Frijol Tamazulapa	Mosaico, reducción tamaño y deformación en hojas jóvenes.	21
3-9-93	21	Trébol Rojo	No presentó síntomas	
30-8-93	22	Haba Toluca MEX	Mosaico suave en hojas jóvenes.	35
30-8-93	23	Haba ICTA Blanquita	No presentó síntomas	
22-8-93	25	Frijol Ostua	Mosaico, reducción tamaño y deformación en hojas jóvenes.	18

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición.

Otro virus utilizado fue el CYVV (Clover Yellow Vein Virus), el cual se inoculó inicialmente en las mismas 15 variedades de plantas que se usaron para el BYMV en su primera inoculación. No se hizo reinoculación. Los resultados se presentan en la Tabla VI.4.

**TABLA VI.4.** Síntomas producidos por el virus CYVV inoculado. Guatemala, marzo de 1993.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
26-3-93	1	Arveja Oregon Sugar Pod II	Sin síntomas claros	
26-3-93	2	Arveja Kawana	No presentó síntomas	
23-3-93	3	Arveja Melting Sugar	Borde hojas doblado hacia arriba, síntomas poco claros	9
26-3-93	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
26-3-93	5	Arv.Oregon S.Pod II	No presentó síntomas	
26-3-93	7	Arv.Oregon S.Pod	No presentó síntomas	
26-3-93	9	Arv.Perfected F. 60	No presentó síntomas	
26-3-93	10	Arveja Oregon Giant	No presentó síntomas	
23-3-93	11	Arveja Taichung No. 13	Aparente mosaico que luego desapareció	9
23-3-93	12	Arveja Taichung 663 No. 11	Aparente mosaico que luego desapareció	13
23-3-93	13	Frijol Black Turtle 2	Epinastía. Aparente mosaico, no claro	9
23-3-93	14	Frijol Black Turtle 1	Epinastía. Aparente mosaico, no claro	9
23-3-93	15	Frijol California Light Red Kidney	Epinastía. Aparente mosaico, no claro	13
23-3-93	16	Pepino Marketmore 70	No hubo síntomas claros	
23-3-93	17	Zucchini Seneca	No hubo síntomas claros	

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición; Arv.=Arveja; Oregon S.Pod=Oregon Sugar Pod; Perfected F. 60=Perfected Freezer 60.

Al igual que para el BYMV, el CYVV fue inoculado nuevamente, en 12 plantas. Se reinocularon el 29/8/1993 excepto en habas y el trébol rojo.

Esta inoculación no produjo sintomatología clara. Se hizo una nueva el 6/12/1993 sobre las mismas plantas exceptuando el Trébol (No. 21). Se reinocularon el

13/12/1993. Los resultados de estas dos inoculaciones están en las Tablas VI.5 y VI.6. 51

**TABLA VI.5.** Síntomas producidos por el virus CYVV inoculado. Guatemala, agosto de 1993.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
22-8-93	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
22-8-93	9	Arveja Perfected Freezer 60	No presentó síntomas	
22-8-93	13	Frijol Black Turtle 2	Leve epinastía en hojas. Síntomas no fueron claros	10
22-8-93	14	Frijol Black Turtle 1	Leve epinastía en hojas. Síntomas no fueron claros	10
22-8-93	15	Frijol California Light Red Kidney	Leve epinastía en hojas. Síntomas no fueron claros	10
22-8-93	18	Arveja Melting Sugar	No presentó síntomas	
22-8-93	19	Arv.Oregon S.Pod II	No presentó síntomas	
22-8-93	20	Frijol Tamazulapa	No presentó síntomas	
3-9-93	21	Trébol Rojo	No presentó síntomas	
29-8-93	22	Haba Toluca MEX	No presentó síntomas	
29-8-93	23	Haba ICTA Blanquita	No presentó síntomas	
22-8-93	25	Frijol Ostúa	No presentó síntomas	

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición; Arv.Oregon S.Pod II=Arveja Oregon Sugar Pod II.

**TABLA VI.6.** Síntomas producidos por el virus CYVV inoculado. Guatemala, diciembre de 1993.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
6-12-93	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
6-12-93	9	Arveja Perfected Freezer 60	No presentó síntomas	
6-12-93	13	Frijol Black Turtle 2	Aparente mosaico pero no claro	20
6-12-93	14	Frijol Black Turtle 1	Aparente mosaico pero no claro	20

TABLA VI.6. Continuación.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
6-12-93	15	Frijol California Light Red Kidney	No presentó síntomas claros	
6-12-93	18	Arveja Melting Sugar	No presentó síntomas	
6-12-93	19	Arv.Oregon S.Pod II	No presentó síntomas	
6-12-93	20	Frijol Tamazulapa	No presentó síntomas	
6-12-93	22	Haba Toluca MEX	No presentó síntomas	
6-12-93	23	Haba ICTABlanquita	No presentó síntomas	
6-12-93	25	Frijol Ostúa	No presentó síntomas	

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición; Arv.Oregon S.Pod II=Arveja Oregon Sugar Pod II.

Debido a la ausencia de síntomas claros, y al probable mal estado del control positivo del virus CYVV, se trabajó con una muestra nueva (enviada por el Dr. R. Provvidenti, Cornell University). Se hizo una nueva inoculación (8/8/1995) sobre 4 plantas y no se hizo reinoculación (Tabla VI.7).

TABLA VI.7. Síntomas producidos por el virus CYVV inoculado. Guatemala, agosto de 1995.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
8-8-95	4	Arveja SnowFlake	No presentó síntomas	
8-8-95	18	Arveja Melting Sugar	Clorosis severa en hojas jóvenes, luego necrosis. Muerte prematura.	7
8-8-95	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	Clorosis y necrosis de hojas, menos severas.	7
8-8-95	20	Frijol Tamazulapa	Clorosis severa en hojas jóvenes, luego necrosis. Muerte prematura.	7

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición.

La primera inoculación con PMV (Pea Mosaic Virus) se hizo en agosto de 1993, sobre 12 plantas. Se hizo reinoculación (el 23/8/93) excepto en las habas y en el trébol rojo.

Los resultados de esta prueba no fueron buenos, se inoculó nuevamente el virus (6/12/93) sobre las mismas plantas excepto en el Trébol (No. 21). Se hizo reinoculación el 13/12/93. Los resultados se muestran en las Tablas VI.8 y VI.9.

**TABLA VI.8.** Síntomas producidos por el virus PMV inoculado. Guatemala, agosto de 1993.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
17-8-93	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
17-8-93	9	Arv. Perfected F.60	No presentó síntomas	
17-8-93	13	Frijol Black Turtle 2	No presentó síntomas	
17-8-93	14	Frijol Black Turtle 1	No presentó síntomas	
17-8-93	15	Frijol California Light Red Kidney	No presentó síntomas	
17-8-93	18	Arveja Melting Sugar	Algunos síntomas aparentes, no claros	15
17-8-93	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	Algunos síntomas aparentes, no claros	15
17-8-93	20	Frijol Tamazulapa	No presentó síntomas	
3-9-93	21	Trébol Rojo	No presentó síntomas	
30-8-93	22	Haba Toluca MEX	No presentó síntomas	
30-8-93	23	Haba ICTA Blanquita	No presentó síntomas	
17-8-93	25	Frijol Ostúa	No presentó síntomas	

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición; Arv. Perfected F.60=Arveja Perfected Freezer 60.

**TABLA VI.9.** Síntomas producidos por el virus PMV inoculado. Guatemala, diciembre de 1993.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
6-12-93	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
6-12-93	9	Arv. Perfected F.60	No presentó síntomas	
6-12-93	13	Frijol Black Turtle 2	Mosaico suave sobre hojas jóvenes	20
6-12-93	14	Frijol Black Turtle 1	Mosaico suave sobre hojas jóvenes	20
6-12-93	15	Frijol California Light Red Kidney	No presentó síntomas	
6-12-93	18	Arveja Melting Sugar	Mosaico sobre hojas jóvenes. Atrofia y enanismo	20
6-12-93	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	Mosaico sobre hojas jóvenes. Atrofia y enanismo	20
6-12-93	20	Frijol Tamazulapa	No presentó síntomas	
6-12-93	22	Haba Toluca MEX	No presentó síntomas	
6-12-93	23	Haba ICTA Blanquita	No presentó síntomas	
6-12-93	25	Frijol Ostúa	No presentó síntomas	

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición; Arv. Perfected F.60=Arveja Perfected Freezer 60.

Se hizo una última inoculación del PMV en agosto de 1995, utilizando control positivo nuevo (enviado por el Dr. R. Providenti, Cornell University). Se usaron 4 plantas y no se hizo reinoculación (Tabla VI.10).

**TABLA VI.10.** Síntomas producidos por el virus PMV inoculado. Guatemala, agosto de 1995.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
8-8-95	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
8-8-95	18	Arveja Melting Sugar	Mosaico, clorosis y necrosis hojas jóvenes. Poca reducción tamaño	20

**TABLA VI.10.** Continuación.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
8-8-95	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	Mosaico hojas jóvenes, luego más evidente. Necrosis y enanismo.	17
8-8-95	20	Frijol Tamazulapa	Mosaico suave en hojas jóvenes	20

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición.

También se inocularon los virus PEMV (Pea Enation Mosaic Virus) (14/6/94) y las razas **Lentil** y **Standard** del PSbMV (Pea Seed-borne Mosaic Virus) (10/6/94). Se usaron 11 plantas. Se hizo una reinoculación (el 22/6/94 para los dos PSbMV y el 23/6/94 para el PEMV). Estas tres inoculaciones no produjeron ningún síntoma. Las plantas usadas se muestran en la Tabla **VI.11.**

**TABLA VI.11.** Plantas inoculadas con los virus PEMV y PSbMV (Lentil y Standard). Guatemala, junio de 1994.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos
6-94	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas
6-94	9	Arveja Perfected Freezer60	No presentó síntomas
6-94	13	Frijol Black Turtle 2	No presentó síntomas
6-94	14	Frijol Black Turtle 1	No presentó síntomas
6-94	15	Frijol California light red kidney	No presentó síntomas
6-94	18	Arveja Melting Sugar	No presentó síntomas
6-94	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	No presentó síntomas
6-94	20	Frijol Tamazulapa	No presentó síntomas
6-94	22	Haba Toluca MEX	No presentó síntomas
6-94	23	Haba ICTA Blanquita	No presentó síntomas
6-94	25	Frijol Ostúa	No presentó síntomas

Debido a los malos resultados obtenidos, se utilizó un nuevo control positivo enviado de Cornell University para inocular el virus PSbMV raza Standard. Se usaron 4 plantas y no se hizo reinoculación (Tabla VI.12).

**TABLA VI.12.** Síntomas producidos por el virus PSbMV raza **Standard** inoculado. Guatemala, agosto 1995.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días apar. <sup>a</sup>
8-8-95	4	Arveja Snow Flake	Mosaico fuerte en hojas jóvenes. Enanismo.	30
8-8-95	18	Arveja Melting Sugar	Ausencia de síntomas claros	
8-8-95	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	Mosaico suave en hojas jóvenes. Plantas con poca reducción de tamaño	17
8-8-95	20	Frijol Tamazulapa	<b>No</b> presentó síntomas	

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición.

FASE II: INOCULACION DE MUESTRAS DEL CAMPO SOBRE LAS PLANTAS INDICADORAS SELECCIONADAS.

Algunas muestras de campo con sintomatología de virosis se inocularon sobre plantas indicadoras seleccionadas en la fase I. Se usaron muestras de 5 plantaciones; **A1293**, **B1293**, **M1194** y **N1194**. La primera de éstas con dos muestras, la **AS1293**, con síntomas más fuertes de mosaico y la **ASV1293** con síntomas un poco más leves y más sobresaliente un aclareo de venas. Los resultados de estas inoculaciones están descritos en las Tablas **VI.13**, **VI.14**, **VI.15**, **VI.16** y **VI.17**.

Para inocular las primeras muestras (AS1293, ASV1293 Y BS1293) se utilizaron 11 plantas. Se reinocularon el 23/6/94 la AS y el 24/6/94 la ASV y BS.

**TABLA VI.13.** Síntomas producidos por la muestra AS1293 inoculada. Guatemala, junio de 1994.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
14-6-94	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
14-6-94	9	Arveja Perfected Freezer 60	No presentó síntomas	
14-6-94	13	Frijol Black Turtle 2	Mosaico fuerte y hojas con leve enrollamiento	10
14-6-94	14	Frijol Black Turtle 1	Mosaico fuerte y hojas con leve enrollamiento	10
14-6-94	15	Frijol California Light Red Kidney	No presentó síntomas claros	
14-6-94	18	Arveja Melting Sugar	Mosaico suave en hojas jóvenes. Enanismo.	10
14-6-94	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	Mosaico suave en hojas jóvenes. Planta con enanismo más evidente.	10
14-6-94	20	Frijol Tamazulapa	Síntomas de mosaico pero menos claros que los otros frijoles	10
14-6-94	22	Haba Toluca MEX	Mosaico suave en hojas jóvenes. Enanismo.	10
14-6-94	23	Haba ICTA Blanquita	Mosaico suave en hojas jóvenes. Enanismo.	10
14-6-94	25	Frijol Ostúa	Síntomas claros de mosaico y hojas con leve enrollamiento	10

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición.

58  
**TABLA VI.14.** Síntomas producidos por la muestra ASV1293 inoculada. Guatemala, junio de 1994.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
15-6-94	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
15-6-94	9	Arveja Perfected Freezer 60	No presentó síntomas	
15-6-94	13	Frijol Black Turtle 2	Síntomas suaves de mosaico y hojas con leve enrollamiento	10
15-6-94	14	Frijol Black Turtle 1	Síntomas suaves de mosaico y hojas con leve enrollamiento	10
15-6-94	15	Frijol California Light Red Kidney	No presentó síntomas claros	
15-6-94	18	Arveja Melting Sugar	Mosaico más marcado, color amarillo más fuerte. Enanismo.	10
15-6-94	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	No presentó síntomas claros	
15-6-94	20	Frijol Tamazulapa	Síntomas suaves de mosaico y hojas con leve enrollamiento	10
15-6-94	22	Haba Toluca MEX	Mosaico suave hojas jóvenes. Reducción en tamaño de plantas	10
15-6-94	23	Haba ICTA Blanquita	Mosaico suave hojas jóvenes. Reducción en tamaño de plantas	10
15-6-94	25	Frijol Ostúa	Sin síntomas claros	

**Notas:** <sup>a</sup> Días a aparición.

**TABLA VI.15.** Síntomas producidos por la muestra BS1293 inoculada. Guatemala, junio de 1994.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
15-6-94	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
15-6-94	9	Arveja Perfected Freezer 60	No presentó síntomas	
15-6-94	13	Frijol Black Turtle 2	Síntomas suaves de mosaico y hojas con leve enrollamiento	10
15-6-94	14	Frijol Black Turtle 1	Síntomas suaves de mosaico y hojas con leve enrollamiento	10

TABLA VI.15. Continuación.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
15-6-94	15	Frijol California Light Red Kidney	No presentó síntomas claros	
15-6-94	18	Arveja Melting Sugar	Mosaico suave hojas jóvenes. Enanismo.	10
15-6-94	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	Mosaico suave hojas jóvenes. Enanismo más evidente.	10
15-6-94	20	Frijol Tamazulapa	Sin síntomas claros	
15-6-94	22	Haba Toluca MEX	Sin síntomas claros	
15-6-94	23	Haba ICTA Blanquita	Sin síntomas claros	
15-6-94	25	Frijol Ostúa	Sin síntomas claros	

Notas: <sup>a</sup> Días a aparición.

Las otras dos muestras (MS1194 y NS1194) fueron inoculadas sobre 4 plantas en agosto de 1995. Se hizo una reinoculación el 2/8/95 para las plantas No. 18 y 19 y el 11/8/95 para las No. 4 y 20.

TABLA VI.16. Síntomas producidos por la muestra MS1194 inoculada. Guatemala, julio y agosto de 1995.

Fecha inoc.	No	Variedad Planta	Síntomas producidos	Días ap. <sup>a</sup>
2-8-95	4	Arveja Snow Flake	No presentó síntomas	
27-7-95	18	Arveja Melting Sugar	Sin síntomas claros	
27-7-95	19	Arveja Oregon Sugar Pod II	Sin síntomas claros	
2-8-95	20	Frijol Tamazulapa	Hojas jóvenes con leve enrollamiento. Mosaico fuerte contrastando con áreas de la hoja verde oscuro.	25

Notas: <sup>a</sup> Días a aparición.

**TABLA VI.18.** Diferentes sintomatologías encontradas en el campo.

Descripción de Síntomas	Id <sup>a</sup>	Plantaciones en las que se encontraron <sup>b</sup>
Síntomas claros, mosaico fuerte en hojas más jóvenes. Cierta reducción del tamaño de la planta.	S	A1293, B1293, L1194, M1194, N1194.
Síntomas de mosaico más suave. Aclareo de venas en hojas jóvenes como característica. Cierta reducción del tamaño de la planta.	SV	A1293, B1293, L1194, M1194, N1194.
Síntomas no bien definidos, no seguros. Clorosis de hojas, pero mosaico no evidente. Síntomas aparentes.	SA	A1293, D1293, H0394, L1194, M1194, N1194.
No hay mosaico evidente. Hojas jóvenes con cierto amarillamiento y a la vez se diferencian áreas o manchas verde oscuras.	SAMV	N1194
Mosaico fuerte y evidente, y además aclareo suave de venas.	SSV	N1194
Mosaico suave en hojas. Planta atrofiada y reducida de tamaño como principal característica (enanismo).	CH	A1293

**Notas:** <sup>a</sup> Clave para identificación.

<sup>b</sup> Las plantaciones se describen en el Apéndice D.

### C. LABORATORIO:

#### 1. MUESTRAS PROCESADAS:

En el laboratorio se procesaron 43 muestras procedentes del campo (**Apéndice E**), divididas en 314 submuestras. Además se procesaron algunas muestras del invernadero tomadas de las plantas inoculadas en la Fase I y II.

## 2. MICROSCOPIA DE LUZ:

Se montaron 54 placas (Tabla VI.19), observándose diferencias entre células sanas y células enfermas, sobre todo en la malformación del núcleo y los estomas. Fue posible detectar en varias placas, inclusiones cristalinas (citoplasmáticas y nucleares), y acumulaciones granulares de material del virus, generalmente alrededor del núcleo.

Los cristales se observaron mejor teñidos de un color verde marrón al usar el colorante Orange-Green, pero el interior de la célula se mostró siempre muy sucio. Las acumulaciones se observaron de color naranja oscuro.

Usando Azure A se logró distinguir las acumulaciones granulares de color violeta. Los cristales, aunque no se colorearon, sí se detectaron, y el interior de la célula se observó más limpio.

El patrón de inclusiones observado en las placas fue muy similar para todas las muestras, y aunque no se pudo hacer una diferenciación específica de algún virus, se observaron cristales nucleares y citoplasmáticos parecidos a los que generalmente induce el virus BYMV y sus diferentes razas.

**TABLA VI.19.** Muestras de tejido coloreadas para observar cuerpos de inclusión.

Virus	Colorante usado	No. Placas	Plantas
BYMV	ORANGE-G	8	ASF, AOSP, AOSP II, AT13, FS, FBT2
	AZURE A	8	ASF, AOSP, AOSP II, AT13, FS, FBT2
CYVV	ORANGE-G	4	ASF, AOSP II, AMS
	AZURE A	9	ASF, AOSP, AOSP II, AMS, FS, FBT2
PMV	ORANGE-G	5	ASF, AOSP II, AMS
	AZURE A	3	ASF, AOSP II, AMS
PSbMV	ORANGE-G	2	ASF, AOSP II
INV.	ORANGE-G	11	AMSS, HTMS, AOSP Ii (AS), AMSi (BS) AMSi (NS), FBT1i (ASV), FBT1i (BS), FTi (AS), FTi (MS), HTMi (ASV), HIB (AS).
CAMPO	ORANGE-G	4	Muestras NN, NS, NSA, NSV 1194

**Notas:** INV.=Invernadero; ASF=Arveja Snow Flake; AOSP=Arveja Oregon Sugar Pod; AOSP II=Arveja Oregon Sugar Pod II; AMS=Arveja Melting Sugar; AT13=Arveja Taichung 13; FS=Frijol sano; FBT1, FBT2=Frijol Black Turtle 1 y 2; FT=Frijol Tamazulapa; HTM=Haba Toluca MEX; HIB=Haba ICTA Blanquita; s=Planta sana; i=Planta inoculada en invernadero y entre paréntesis la muestra del campo usada.

### 3. PRUEBAS DE ELISA:

Las primeras pruebas fueron corridas para los virus CMV (Cucumber Mosaic Virus), y el TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus).

Para el virus **CMV** se utilizaron 42 muestras de campo, distribuidas en dos placas de ELISA. En la placa No.1 se colocaron 16 muestras y 26 en la No.2.

Los **puntos de corte** calculados fueron de **0.06** para la placa No.1 y **0.03** para la No.2. Ninguna muestra de arveja se encontró positiva al virus, aunque la muestra de haba (K0994) reaccionó positivamente (Apéndice F, Tablas F.1 y F.2).

Para el virus **TSWV** se corrieron también 42 muestras de campo, utilizando dos placas de ELISA. En la placa No.1 se colocaron 20 muestras y 22 en la No.2.

El **punto de corte** para las dos placas corridas fue de: **0.05**. No se encontró ninguna muestra positiva al virus (Apéndice F, Tablas F.3 y F.4).

Las siguientes pruebas que se corrieron fueron con antisueros para los virus PSbMV (Pea Seed-borne Mosaic Virus), CYVV (Clover Yellow Vein Virus), BYMV (Bean Yellow Mosaic Virus), y el Monoclonal para reacciones cruzadas de Potyvirus PTY8. La técnica utilizada fue el ELISA indirecto.

La prueba para el **PSbMV** se hizo sobre 82 muestras de plantas de campo, distribuidas en dos placas de ELISA.

En la placa No.1 se colocaron 43 muestras y el **punto de corte** para ésta fue de **0.11**. Se encontraron 8 muestras positivas al virus, aunque con valores de absorbancia muy bajos (Apéndice F, Tabla F.5).

En la placa No.2 se colocaron 39 muestras de campo y una muestra de arveja sana Snow Flake tomada del invernadero. Se calculó un **punto de corte** de **0.07**. Se encontraron 15 muestras positivas al virus, aunque con valores muy bajos de absorbancia (Apéndice F, Tabla F.6).

Para el virus **CYVV** se utilizaron las mismas 82 muestras que para el PSbMV, distribuidas en dos placas.

En la placa No.1 se colocaron 43 muestras de campo, siendo el **punto de corte** de **0.24**. Se detectaron 9 muestras positivas al virus (Apéndice F, Tabla F.7).

En la placa No.2 se colocaron 39 muestras de campo, más una muestra de arveja sana Snow Flake y una de Oregon Sugar Pod II inoculada con CYVV, las dos tomadas del invernadero. El **punto de corte** para esta placa fue de **0.19**. Se detectaron 17 muestras positivas al virus (Apéndice F, Tabla F.8).

El **BYMV** se corrió también para 82 muestras, y se usaron 3 placas de ELISA.

La placa No.1 con un **punto de corte** de **0.28**, resultando 13 muestras de campo positivas de un total de 36 (Apéndice F, Tabla F.9).

Para la placa No.2, también con 36 muestras de campo, se calculó un **punto de corte** de **0.34** y se detectaron 12 muestras positivas (Apéndice F, Tabla F.10).

Finalmente, la placa No.3, con 10 muestras de campo y 8 muestras de plantas inoculadas en el invernadero. Se calculó un **punto de corte** de **0.24**, y se detectaron positivas, 8 de campo y todas las demás de invernadero (Apéndice F, Tabla F.11).

Los resultados serológicos obtenidos hasta este punto demostraron posibles reacciones cruzadas entre los virus PSbMV, BYMV, y CYVV, porque las muestras detectadas positivas fueron en su mayoría las mismas para los tres (aunque el PSbMV con valores más bajos) (Tabla VI.21).

Se hizo una prueba para determinar las reacciones de los controles positivos de BYMV, CYVV, PSbMV y PMV ante los antisueros de BYMV, CYVV, PSbMV y el PTY8 (reacciones cruzadas de Potyvirus). No se incluyó el antisuero para PMV porque no estuvo disponible, pero se determinó que su control positivo da resultados cruzados con los otros 3 virus (Tabla VI.20).

**TABLA VI.20.** Prueba para detectar reacciones cruzadas entre los virus BYMV, CYVV, PSbMV y PMV. Guatemala, febrero 1996.

PRUEBA <sup>a</sup>	PUNTO DE CORTE	CONTROL + BYMV	CONTROL + CYVV	CONTROL + PSbMV	CONTROL + PMV
ELISA para BYMV	0.22	0.37 <b>POSITIVO</b>	0.38 <b>POSITIVO</b>	0.14 NEGATIVO	0.35 <b>POSITIVO</b>
ELISA para CYVV	0.14	0.205 <b>POSITIVO</b>	0.34 <b>POSITIVO</b>	0.115 NEGATIVO	0.34 <b>POSITIVO</b>
ELISA para PSbMV	0.08	0.12 <b>POSITIVO</b>	0.11 <b>POSITIVO</b>	0.18 <b>POSITIVO</b>	0.12 <b>POSITIVO</b>
ELISA para PTY 8	0.08	0.38 <b>POSITIVO</b>	0.06 NEGATIVO	0.06 NEGATIVO	0.30 <b>POSITIVO</b>

**Notas:** <sup>a</sup> Se utilizó el ELISA indirecto sin cobertura inicial. Los tiempos de lectura de absorbancia fueron de 35 minutos para el BYMV y PTY8, y 1 hora para el CYVV y PSbMV.

Se realizaron entonces, pruebas con las muestras que hasta ahora resultaron positivas para BYMV, CYVV y PSbMV, usando el anticuerpo monoclonal para Potyvirus **PTY8**. Se

utilizaron 52 de estas muestras positivas, 3 muestras sanas, y los controles positivos para BYMV, PMV, CYVV y PSbMV distribuidas en 2 placas.

La Placa No.1 con 24 muestras y un **punto de corte** de **0.075**. Todas las muestras resultaron positivas, excepto las sanas y los controles para PSbMV y CYVV (Apéndice F, Tabla F.12).

La Placa No.2 con 28 muestras y un **punto de corte** de **0.11**, resultando 24 positivas, y también positivos los controles para PMV y BYMV (Apéndice F, Tabla F.13).

La Tabla **VI.21** describe 53 muestras y su reacción y relación con cada uno de los antisueros usados.

**TABLA VI.21.** Muestras con reacciones cruzadas ante los antisueros de BYMV, CYVV, PSbMV (policlonales) y PTY8 (monoclonal), utilizando la técnica de ELISA Indirecto sin cobertura inicial.

MUESTRA	ANTI-BYMV	ANTI-CYVV	ANTI-PSbMV	PTY 8
ACH1293 (1)	****	****	****	Negativo
AS1293 (2)	Positivo	****	****	Positivo
AS1293 (8)	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
AS1293 (10)	****	Positivo	Negativo	Positivo
ASV1293 (1)	Positivo	Positivo	Positivo	****
ASV1293 (2)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BS1293 (3)	****	Positivo	Positivo	Positivo
BS1293 (5)	Positivo	****	****	Positivo
BS1293 (6)	****	Positivo	Positivo	Positivo
BS1293 (7)	Positivo	****	****	Positivo
BSV1293 (1)	Positivo	****	****	Positivo
BSV1293 (2)	****	Positivo	Positivo	Positivo
BSV1293 (3)	****	Positivo	Positivo	Positivo
BSV1293 (4)	Positivo	****	****	Positivo
DSA1293 (1)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LS1194 (1)	****	Positivo	Positivo	Positivo
LS1194 (2)	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
LS1194 (3)	Positivo	****	****	Positivo

TABLA VI.21. Continuación.

MUESTRA	ANTI-BYMV	ANTI-CYVV	ANTI-PSbMV	PTY 8
LSV1194 (2)	****	Positivo	Positivo	Positivo
LSV1194 (4)	Positivo	****	****	Positivo
LSV1194 (7)	Positivo	****	****	Positivo
LSV1194 (9)	****	Positivo	Positivo	Positivo
LSF1194 (2)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LSF1194 (3)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
MS1194 (1)	****	Positivo	Positivo	Positivo
MS1194 (3)	Positivo	****	****	Positivo
MS1194 (4)	****	Positivo	Positivo	Positivo
MS1194 (5)	Positivo	****	****	Positivo
MSV1194 (1)	****	Negativo	Negativo	Positivo
MSV1194 (2)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
MSV1194 (3)	Positivo	****	****	Positivo
NS1194 (3)	****	Positivo	Positivo	Positivo
NS1194 (8)	Positivo	****	****	Positivo
NS1194 (19)	****	Positivo	Positivo	Positivo
NS1194 (28)	Positivo	****	****	Positivo
NSV1194 (1)	Positivo	****	****	Positivo
NSV1194 (3)	****	Positivo	Positivo	Positivo
NSV1194 (5)	Positivo	****	****	Positivo
NSV1194 (6)	****	Negativo	Negativo	Positivo
NSA1194 (1)	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
NSA1194 (2)	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
NSF1194 (2)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
NSF1194 (3)	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
NSAMV1194 (2)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
NSAMV1194 (5)	Positivo	****	****	Negativo
NSAMV1194 (6)	****	Positivo	Positivo	Positivo
NSSV1194 (2)	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
NSSV1194 (7)	Positivo	****	****	Positivo
NSSV1194 (8)	****	Positivo	Positivo	Positivo
NN1194 (1)	Positivo	****	****	Positivo
NN1194 (2)	****	Negativo	Negativo	Negativo
NN1194 (5)	****	Negativo	Negativo	Negativo
NN1194 (6)	Positivo	****	****	Positivo
<b>Promedio Control Pos.</b>	<b>0.60</b>	<b>1.005</b>	<b>0.87</b>	<b>BYMV= 0.32 PMV= 0.247</b>
<b>Promedio Muestras Pos.</b>	<b>0.56</b>	<b>0.36</b>	<b>0.17</b>	<b>0.25</b>

Notas: \*\*\*\* No se analizaron.

## VII. DISCUSION

Los resultados de la investigación fueron satisfactorios porque además de su valor implícito, éstos se lograron superando las dificultades que en Guatemala existen para llevar a cabo estudios de esta naturaleza. Así, los materiales básicos como muestras positivas de los virus, anticuerpos, enzimas, y algunos más, se adquirieron fuera del país, lo cual se convierte en una limitante importante. Por otra parte, la información que se pudo encontrar sobre enfermedades virales de los cultivos en Guatemala es relativamente escasa, y casi nula para la arveja china. Por esto los resultados del trabajo se consideran de importancia, porque servirán de base para incentivar, mejorar e incrementar las investigaciones en este campo.

En las Fases I y II de invernadero se lograron los resultados esperados, puesto que en ambas se reprodujeron síntomas claros y consistentes, y a la vez se observó la reacción de susceptibilidad, tolerancia o resistencia de las plantas inoculadas.

En términos generales, la técnica de inoculación mecánica funcionó muy bien, mostrándose ésto en los resultados. Se determinó que se puede usar arena blanca cernida como abrasivo en caso de no disponer de Carborundum o alguno de los otros

materiales específicamente utilizados. Solamente cuidando de hacer la aplicación con precaución al inocular tejido muy sensible.

Al inocular las plantas en un estado juvenil se obtuvieron mejores resultados. El frijol se pudo inocular al tener sus dos primeras hojas, pero para arveja y haba debió esperarse a que tuvieran 6 u 8, debido a que éstas son más pequeñas y se abren con mayor lentitud.

La reinoculación debe hacerse lo más pronto posible sobre las nuevas hojas que se hayan formado después de la primera vez, generalmente a los ocho o diez días.

Para el procedimiento de rehidratación de las muestras de virus (Apéndice A, Sección II) es muy importante el tiempo que se deja el tejido desde su maceración con la solución amortiguadora hasta su uso como inóculo. Este tiempo de absorción debe ser de 30 minutos aproximadamente.

También debe considerarse que si las muestras no están almacenadas bajo condiciones adecuadas (sin humedad y a 4°C), después de cierto tiempo pueden perder sus características de infectividad. De hecho algunas se pierden después de un año, principalmente cuando se han utilizado varias veces y de la misma forma las condiciones de almacenamiento se han alterado. Este factor pudo haber influido en la no aparición de síntomas al inocular ciertas muestras en el invernadero.

Otra condición que pudo afectar el desarrollo de sintomatología fue la temperatura dentro del invernadero. Se registraron temperaturas máximas de hasta 36°C, con una media de 32°C, y mínimas de 22°C como media. Debe hacerse notar que las altas temperaturas pueden en algunos casos inhibir la evolución de los virus, impidiendo el desarrollo de los síntomas, sobre todo cuando éstas se dan en el tiempo cercano a la inoculación (Walkey, 1985).

Inicialmente se utilizaron plantas indicadoras como el pepino, el zucchini, el trébol, y algunas variedades de arveja, que al final se descartaron. Las tres primeras porque no mostraron en ningún momento síntomas de infección, y las otras porque cuando los presentaron, éstos fueron dudosos e inconsistentes, algunos desaparecieron después de un tiempo. Esta característica no era adecuada en esta etapa del proyecto porque se buscaban plantas con síntomas definidos.

Luego se decidió trabajar con semillas de las variedades de arveja china, haba y frijol frecuentemente usadas en el país. Las posteriores inoculaciones mostraron resultados más satisfactorios. Se logró producir sintomatología clara y definida. Se pudo determinar así mismo que dos de las variedades de arvejas chinas más utilizadas en Guatemala, la Oregon Sugar Pod II (enana) y la Melting Sugar (gigante), son susceptibles a los virus más

importantes que se estudiaron, tanto el BYMV (Bean Yellow Mosaic Virus), CYVV (Clover Yellow Vein Virus) y el PMV (Pea Mosaic Virus). También es importante citar la reacción de susceptibilidad del frijol (BYMV, CYVV, y algunos a PMV) y el haba (BYMV); cultivos que frecuentemente se encuentran en el campo como cultivos vecinos o de rotación, y que pueden ser hospederos alternos y fuente de inóculo para la arveja.

En la mayoría de los casos, el tiempo de aparición de los primeros síntomas después de la inoculación fue relativamente corto, indicando ésto la facilidad de transmisión de los virus por esta vía.

Es muy importante hacer notar que las arvejas Snow Flake y Perfected Freezer 60 resultaron resistentes al ser inoculadas con estos tres virus (BYMV, CYVV y PMV), mostrando un crecimiento normal durante todo su desarrollo. Lo anterior especialmente debido a que la primera de estas variedades es cultivada en Guatemala.

Los resultados también mostraron un indicio de tolerancia en la arveja variedad Kawana a los virus BYMV y CYVV, porque al hacer las inoculaciones se observaron aparentes síntomas de mosaico que con el tiempo desaparecieron. Esto es importante porque esta variedad también se cultiva en el país.

Con el virus PEMV (Pea Enation Mosaic Virus) no fue posible inducir sintomatología, a pesar que según Peters (1982) el virus es fácilmente transmitido mecánicamente, creyéndose que el virus encontró algún factor adverso en la planta o el ambiente. Es posible que el control positivo haya estado en mal estado, o bien la reinoculación no fue hecha lo suficientemente temprano. Aunque debe decirse que los síntomas observados en el campo en ningún momento mostraron las enaciones características de este virus.

Al inocular el virus PSbMV (Pea Seed-borne Mosaic Virus) raza Standard, se lograron síntomas claros en las arvejas Oregon Sugar Pod II y Snow Flake, no así en la variedad Melting Sugar, aunque fue necesario inocular en más de una ocasión para obtener resultados positivos. Los síntomas inducidos por este virus fueron similares a los de PMV, con la diferencia que la arveja Snow Flake resultó susceptible, algo que no ocurrió con ningún otro virus, y tampoco muestras del campo.

La sintomatología inducida por el control positivo de CYV (Clover Yellow Vein Virus) se caracterizó por un mosaico fuerte, pero sobre todo por una necrosis general de la planta, iniciándose en la parte más joven y con más síntomas, hasta llegar a la muerte prematura del huésped. A diferencia, las muestras del campo no produjeron este tipo de sintomatología, sino más bien mosaicos, sin necrosis severa y tampoco muerte prematura.

De acuerdo a Smith (1972) el PMV (Pea Mosaic Virus) no infecta a plantas de frijol, sin embargo en invernadero se detectaron síntomas de mosaico sobre las variedades de frijol Black Turtle 1, Black Turtle 2 y Tamazulapa.

La susceptibilidad de Black Turtle 1 a PMV es conocida, y a la vez la resistencia de la variedad California Light Red Kidney, pero no se tenía certeza de la susceptibilidad de las variedades Black Turtle 2 y Tamazulapa, detalle que se confirmó con los resultados obtenidos. Esto nos indica que no se puede generalizar el patrón de infección negativo del PMV al *Phaseolus vulgaris*, y ello es importante porque la variedad Tamazulapa es cultivada en el medio.

Para el proceso de identificación de este virus, fueron muy importantes las manifestaciones de síntomas, porque no se dispuso de un antisuero específico, y las pruebas de ELISA corridas fueron con el monoclonal PTY8 para Potyvirus, que lo detecta, pero también sucede esto con otros virus del mismo grupo.

Se observó que los síntomas inducidos por el PMV sobre las plantas de arveja específicamente, consistieron en la presencia de un mosaico fuerte y bien marcado, el color amarillo siempre fue más intenso, y las plantas se vieron más sensibles, principalmente por mostrar enanismo, especialmente en la variedad Oregon Sugar Pod II. Los síntomas en los frijoles fueron más suaves, y no se logró inducirlos en la variedad California Light Red Kidney.

En el campo se observaron distintos niveles de afección, y uno de éstos, el más fuerte, era muy similar a los producidos por PMV en invernadero.

Al inocular las muestras de campo también se obtuvieron síntomas fuertes de mosaico sobre las arvejas, que también se vieron reducidas de tamaño. Las plantas de frijol en cambio, presentaron mosaicos más suaves y menor reducción de tamaño. La variedad California Light Red Kidney no se infectó.

Con el BYMV (Bean Yellow Mosaic Virus) se produjeron síntomas tanto en arveja como en frijoles, éstos fueron generalmente mosaicos más suaves que los inducidos por PMV. Todas las variedades de frijol fueron afectadas, incluyendo la California Light Red Kidney.

En los viajes de campo se observó la alta incidencia de virosis dentro de las plantaciones. La distribución de las plantas infectadas permite deducir que el virus se disemina con facilidad hacia plantas sanas, principalmente por falta de medidas preventivas como eliminación de plantas de arveja infectadas, eliminación de rastros, desinfección de herramientas y equipo, control de hospederos y vectores, etc. Lo anterior generalmente se debe a la falta de conocimiento que se tiene sobre este tipo de enfermedades, llegando a confundirlas con otros patógenos,

especialmente marchitez por *Fusarium* sp., o deficiencias nutricionales.

Las zonas más afectadas fueron los alrededores de Zaragoza y Santa Cruz Balanyá, Chimaltenango. Se tenía conocimiento que en el área de Patzún también había alta incidencia de virosis (Calderón, 1994. Comunic.pers.), pero no fue posible encontrar síntomas en las localidades que fueron muestreadas.

Se observó que en el campo la variedad Oregon Sugar Pod II (enana), presentó síntomas más acentuados que la gigante (Melting Sugar), y en el caso de la Snow Flake y arvejas dulces, no se encontraron síntomas.

Los muestreos en el campo cubrieron todas las épocas del año, ésto permitió observar que la presencia de síntomas viróticos en las plantaciones fue mayor en los meses de octubre, noviembre y diciembre. Las plantas de las que se obtuvieron resultados positivos de infección fueron recolectadas en estos meses, fuera de los cuales no se obtuvo muestras infectadas.

Los factores que pueden influir en esta característica son las principales épocas de siembra de la arveja. Generalmente se inicia un ciclo de cultivo en el mes de agosto que se extiende hasta diciembre, y luego otro en marzo o abril, que cubre menor extensión y la mayoría de veces son plantaciones con riego. También influye el ciclo de vida de los áfidos, que para el caso

de los Potyvirus son los vectores de mayor importancia, porque en la época de fin de año regresan a su hospedero primario luego de haberse reproducido en gran cantidad en el secundario, aumentando así la población de estos insectos en las plantaciones de arveja, y con ésto la transmisión de enfermedades virales.

La diferenciación serológica entre los virus (BYMV, PMV, CYVV) se hizo complicada porque pertenecen al mismo grupo (Potyvirus), además algunos autores consideran a los dos últimos como razas del primero. Según Smith (1972 y 1974), algunos estudios determinaron la estrecha relación serológica entre dos muestras de PMV y una de BYMV, y al final consideraron a todas las muestras analizadas como razas de BYMV. Al mismo tiempo Bos (1970) señala también al PMV como una raza de BYMV.

Smith (1972) describe la sintomatología de una raza severa de BYMV que luego se consideró como el CYVV (Palmieri, 1995. Comunic. pers.), además Bos (1970) y el mismo Smith mencionan la relación entre estos dos virus.

Los resultados de las pruebas de ELISA confirmaron la dificultad de separar serológicamente estos tres virus, porque se determinaron reacciones cruzadas entre los controles positivos y los anticuerpos policlonales usados, con el agregado que también

el PSbMV demostró tener alguna relación, aunque en menor grado (Tabla VI.20).

Para el virus PSbMV, se detectaron 23 muestras positivas (28.05% del total), sin embargo, sus valores de absorbancia fueron mucho más bajos que los de los controles positivos (Tabla VI.21).

El virus CYV dio algunos resultados positivos (26 muestras, un 31.71% del total), y sus valores de absorbancia estuvieron un poco más cercanos a los valores de los controles positivos (Tabla VI.21).

Un total de 33 muestras positivas (40.25% del total) se detectaron para el BYMV, y el promedio de los valores de absorbancia fue muy similar al de los controles (Tabla VI.21).

Las muestras positivas detectadas fueron en su mayoría las mismas para los tres virus, salvo algunas pocas excepciones (Tabla VI.21).

Estas reacciones cruzadas pueden estar ligadas también al método de ELISA utilizado, porque el Indirecto tiende a detectar un rango más amplio de virus relacionados y es menos específico que el Directo (Matthews, 1991).

Al utilizar el anticuerpo monoclonal PTY8, las reacciones cruzadas se vieron vinculadas solamente a dos virus, lográndose

separar el CYVV y el PSbMV, que dieron resultados negativos, y el BYMV y PMV que resultaron positivos (Tabla VI.20). Con este antisuero se aumentó la especificidad, aunque estos virus por ser los más relacionados y semejantes serológicamente reaccionaron igual, y no se pudieron diferenciar.

Todas las muestras analizadas con PTY8 resultaron positivas, excepto un caso, por lo que se puede decir que con base en la serología, el virus presente en el campo es un Potyvirus, que puede ser el PMV o BYMV.

Estos dos virus pueden distinguirse por el tipo de cuerpos de inclusión, porque se sabe que ambos inducen la formación de cristales citoplasmáticos y nucleares, que según Christie y Edwardson (1977), son diferentes en los dos casos. Para PMV se describen cristales planos y angulares tanto en el núcleo como en el citoplasma. El BYMV induce en el citoplasma cristales pequeños y a la vez cristales grandes elongados; y en el núcleo cristales angulares largos.

A pesar que existen estas diferencias entre los cuerpos de inclusión de los virus, con las pruebas realizadas de microscopía de luz, no fue posible determinarlas porque se observaron cristales nucleares y citoplasmáticos pero no se pudieron definir patrones específicos que permitieran separar individualmente a un

virus. La observación se facilitaría si se hiciera con microscopio electrónico.

Por estas razones la caracterización del virus se basó sobre todo en sintomatología.

Se determinó que las variedades de arveja que resultaron susceptibles y resistentes a BYMV, también lo fueron para PMV. Las diferencias deben entonces observarse en las inoculaciones de los frijoles, porque todos fueron susceptibles a BYMV pero sólo algunos a PMV.

Los síntomas de mosaico observados sobre las variedades de frijol Black Turtle 1, Black Turtle 2 y Tamazulapa al inocular el PMV, no permitieron generalizar la característica que este virus no infecta a *Phaseolus vulgaris*.

Fue necesario entonces analizar los resultados obtenidos al inocular la variedad California Light Red Kidney, la cual sí era resistente a PMV. Así, al inocular el virus BYMV se observaron sobre ésta síntomas de mosaico bastante acentuados, similares a los obtenidos al inocular los otros frijoles, pero al inocular tanto el virus PMV como las muestras del campo, no se lograron reproducir síntomas sobre esta variedad, lo cual nos permite deducir que es el virus PMV el que está presente en las plantaciones analizadas.

Es importante la presencia de este virus en los campos de cultivo de arveja china, sobre todo por la alta incidencia que éste presenta en las épocas de siembra del cultivo y en zonas importantes de producción. A la vez es necesario evitar que este patógeno alcance niveles de daño más altos, y ésto puede lograrse si las personas responsables de transferir tecnología, asesoran a los agricultores para que éstos reconozcan los síntomas de la enfermedad y tengan los conocimientos básicos sobre las prácticas culturales que ayuden a disminuir la incidencia del patógeno dentro de sus plantaciones y evitar su propagación hacia otras.

### VIII. CONCLUSIONES

- Utilizando inoculación mecánica se pueden inducir en forma relativamente fácil, síntomas de los virus BYMV, CYVV, PMV y PSbMV, sobre plantas que sean susceptibles a cada uno de ellos.
  
- Las variedades de arveja china más usadas en Guatemala, Oregon Sugar Pod II (enana) y Melting Sugar (gigante), son susceptibles a los virus BYMV, CYVV y PMV.
  
- Las variedades Oregon Sugar Pod II y Snow Flake (mediana) son susceptibles al virus PSbMV.
  
- Las variedades Snow Flake y Perfected Freezer 60 son resistentes a los virus BYMV, CYVV y PMV.
  
- La variedad de frijol California Light Red Kidney mostró ser resistente al virus PMV, pero esta resistencia no se puede generalizar para *Phaseolus vulgaris* debido a la susceptibilidad mostrada por las variedades Black Turtle 1, Black Turtle 2 y Tamazulapa.
  
- La variedad Kawana probablemente tiene tolerancia a los virus BYMV y CYVV.

- Aún conociendo que los cuerpos de inclusión inducidos por los virus BYMV, PMV y CYVV tienen algunas diferencias que permiten distinguirlos, y a pesar de utilizar técnicas de tinción para microscopía de luz, no fue posible hacer una diferenciación entre estos virus, aunque sí se observaron cristales nucleares y citoplasmáticos, así como agregados granulares del virus.
  
- Los anticuerpos policlonales utilizados para BYMV, CYVV y PSbMV, presentaron reacciones cruzadas con controles positivos de estos tres virus y de PMV al realizarse las pruebas de ELISA Indirecto sin cobertura inicial.
  
- Con el antisuero monoclonal PTY8 se aumenta la especificidad de las pruebas, aunque no se logra separar el BYMV del PMV.
  
- Con base en la sintomatología, el virus presente en los campos de arveja muestreados es el PMV.
  
- Aunque los anticuerpos no sean tan específicos, la combinación de las pruebas de ELISA con sintomatología es ideal para la identificación del virus.
  
- Se descarta la hipótesis nula, porque sí hay presencia de virus en los campos de cultivo de la arveja china.

## IX. RECOMENDACIONES

- Usar arena blanca cernida como abrasivo, en caso de no disponer de Carborundum o alguno de los otros materiales utilizados. El abrasivo debe esparcirse sobre la superficie de las hojas antes de la inoculación y no mezclarlo directamente con el inóculo.
  
- Hacer una reinoculación sobre las nuevas hojas que se hayan formado después de la primera vez, generalmente a los ocho o diez días, con ésto se aumenta la probabilidad de causar la infección en la planta.
  
- Para el almacenamiento se aconseja que cada muestra se divida en varias porciones, para usarlas una por una, y así evitar el descongelar y volver a congelar la muestra entera, acción que puede eliminar sus características infectivas.
  
- Inocular mecánicamente un mayor número de muestras sintomáticas y positivas a PTY8 para observar si el patrón de sintomatología se mantiene igual.
  
- Debido a que la variedad Snow Flakes es resistente a los virus más importantes (BYMV, CYVV, PMV), es necesario comparar sus características con las de las variedades comúnmente utilizadas

para determinar si podría sustituir a alguna de ellas y poder ser utilizada como control cultural.

- Realizar pruebas de ELISA con controles positivos de otros Potyvirus y el anticuerpo PTY8, para determinar si alguno de éstos también reacciona positivamente.
  
- Hacer más pruebas con microscopía de luz y mejorar las técnicas para poder obtener resultados con los que se pueda diferenciar más allá del grupo de virus en general.
  
- El anticuerpo monoclonal PTY8 puede usarse para identificación de Potyvirus, y luego hacer la separación entre BYMV y PMV por medio de la sintomatología de plantas indicadoras. Si esto resulta más caro, y si se utiliza la misma técnica de ELISA que en este trabajo, para detectar los potyvirus puede emplearse alguno de los antisueros que tiene reacción cruzada.
  
- Asesorar a los agricultores para que ellos puedan reconocer sintomatología de virus en el campo, y de esta manera implementen medidas de prevención y controles culturales para evitar la diseminación de la enfermedad dentro y fuera de sus plantaciones.

## X. LITERATURA CITADA

- ATCC. 1993. Catalogue of Plant Viruses & Antisera. 7a Ed. American Type Culture Collection, Maryland. 84 pp.
- Badulescu, R.V. 1985. Transmisión mecánica del Virus del Mosaico del Cardamomo (VMCar). Tesis. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 79 pp.
- Bos, L. 1970. Bean Yellow Mosaic Virus. *Descriptions of Plant Viruses*. **40**(10):1-4.
- Brunt, A.; K. Crabtree y A. Gibbs. 1990. Viruses of Tropical Plants. C.A.B. International, Oxon, UK. 707 pp.
- Calderón, E. 1993. Guía práctica para el Control de Plagas y Enfermedades en el cultivo de Arveja China. ICTA/CATIE/ARF, Guatemala. 12 pp.
- Calderón, E. 1994. Gremial de Exportadores de Productos no Tradicionales. Guatemala. Comunicación personal.
- Christie, R.G. y J.R. Edwardson. 1977. Light and Electron Microscopy of Plant Virus Inclusions. Florida Agr. Exp. Sta. Monograph Series No.9. 150 pp.
- Christie, R.G. y J.R. Edwardson. 1986. Light Microscopic Techniques for Detection of Plant Virus Inclusions. *Plant Disease*. **70**(4):273-279.
- Francki, R.I.B.; D.W. Mossop y T. Hatta. 1979. Cucumber Mosaic Virus. *Descriptions of Plant Viruses*. **213**(7):1-4
- García, E. 1992. Manejo racional de Plagas en Arveja China. ICTA/CATIE/ARF, Guatemala. 20 pp.
- García, E.; E. Calderón; G. Alvarez y M. Arias. 1993. Manejo Integrado de Plagas en Arveja China. ICTA/CATIE/ARF, Guatemala. 9 pp.
- Gibbs, A. y B. Harrison. 1976. Plant Virology, The Principles. Edward Arnold Ltd., London. 292 pp.
- Hagedorn, D. 1984. Compendium of Pea Diseases. APS Press, Minnesota. 57 pp.
- Hagedorn, D. y J. Walker. 1954. Virus Diseases of Canning Peas in Wisconsin. *Wis. Agr. Exp. Sta. Res. Bul.* **185**:31 pp.

- Hampton, R. y G. Mink. 1975. Pea Seed-borne Mosaic Virus. *Descriptions of Plant Viruses*. **146**(10):1-4.
- Hampton, R.; E. Ball y S. De Boer. 1990. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, A Laboratory Manual. APS Press, Minnesota. 389 pp.
- Ie, T.S. 1970. Tomato Spotted Wilt Virus. *Descriptions of Plant Viruses*. **39**(10):1-4.
- Jayasinghe, U. y Chuquillanqui, C. 1989. Use of Indicator Plants for detection of Potato Viruses. *CIP Research Guide* **21**, Lima. 29 pp.
- Kurstak, E. 1981. Handbook of Plant Virus Infections, Comparative Diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 943 pp.
- Luria, S.E. y J.E. Darnell. 1967. General Virology. 2a Ed. John Wiley & Sons, New York. 512 pp.
- Maramorosch, K. 1977. The Atlas of Insect and Plant Viruses. Academic Press, New York. 478 pp.
- Matthews, R.E.F. 1981. Plant Virology. 2a Ed. Academic Press, New York. 897 pp.
- Matthews, R.E.F. 1991. Plant Virology. 3a Ed. Academic Press, San Diego. 835 pp.
- Morales, H.; R. Pérez y C. MacVean. 1993. Impacto de cultivos hortícolas no tradicionales de exportación sobre plagas, organismos benéficos y suelo en el Altiplano de Guatemala. Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala. 47 pp.
- Palmieri de Mata, Margarita. 1995. Departamento de Virología, Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. Comunicación personal.
- Peters, D. 1982. Pea Enation Mosaic Virus. *Descriptions of Plant Viruses*. **257**(7):1-5.
- Reyes, K.I. 1994. Detección del Virus de la Tristeza de los cítricos en Guatemala. Tesis. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 120 pp.

- Saravia, M.E. 1988. Cultivo y Exportación de Arveja China de Guatemala. Tesis. Universidad Rafael Landívar, Guatemala. 83 pp.
- Scott, S.W.; M.R. McLaughlin y A.J. Ainsworth. 1989. Monoclonal antibodies produced to bean yellow mosaic virus, clover yellow vein virus, and pea mosaic virus which cross-react among the three viruses. *Archives of Virology*. **108**(7):161-167.
- Sherf, A.F. y A.A. Macnab. 1986. Vegetable Diseases and Their Control. 2a Ed. Willey & Sons, New York. 728 pp.
- Smith, K.M. 1972. A Textbook of Plant Virus Diseases. 3a Ed. Academic Press, New York. 684 pp.
- Smith, K.M. 1974. Plant Viruses. 5a Ed. Chapman & Hall, London. 211 pp.
- Steel, R. y J. Torrie. 1988. Bioestadística, Principios y Procedimientos. 2a Ed. McGraw-Hill, México. 622 pp.
- Walkey, D.G.A. 1985. Applied Plant Virology. Heinemann Ltd., London. 329 pp.
- Zitter, T.A. y R. Provvidenti. 1984. Virus Diseases of Pea. *Vegetable Crops*. Cooperative Extension, Cornell University, New York. Fact Sheet **738**.

METODOLOGÍA DE INVERNADERO

I. Especies y variedades de plantas utilizadas:

CUADRO A.1 Listado de plantas utilizadas para la generación de sintomatología en invernadero.

No	CULTIVO	VARIEDAD	PROCEDENCIA
1	Arveja	Oregon Sugar Pod II	GUATEMALA
2	Arveja	Kawana	GUATEMALA
3	Arveja	Melting Sugar	GUATEMALA
4	Arveja	Snow Flake	GUATEMALA
5	Arveja	Oregon Sugar Pod II	OREGON, EEUU
6	Arveja	Ranger	OREGON, EEUU
7	Arveja	Oregon Sugar Pod	OREGON, EEUU
8	Arveja	Bonneville	OREGON, EEUU
9	Arveja	Perfected Freezer 60	OREGON, EEUU
10	Arveja	Oregon Giant	OREGON, EEUU
11	Arveja	Taichung No.13	CORNELL UNIV., EEUU
12	Arveja	663 Taichung No.11	CORNELL UNIV., EEUU
13	Frijol	Black Turtle 2	CORNELL UNIV., EEUU
14	Frijol	Black Turtle 1	CORNELL UNIV., EEUU
15	Frijol	California Light Red Kidney	CORNELL UNIV., EEUU
16	Pepino	Marketmore 70	CORNELL UNIV., EEUU
17	Zucchini	Seneca Zucchini	CORNELL UNIV., EEUU
18	Arveja	Melting Sugar	GUATEMALA
19	Arveja	Oregon Sugar Pod II	GUATEMALA
20	Frijol	Tamazulapa	GUATEMALA
21	Trébol	Rojo	GUATEMALA
22	Haba	Toluca MEX	GUATEMALA
23	Haba	ICTA Blanquita	GUATEMALA
24	Tomate	Roma	GUATEMALA
25	Frijol	Ostúa	GUATEMALA

II. Rehidratación de muestras para inoculación:

- a.- Colocar el tejido seco en un mortero.
- b.- Sin adicionar ningún amortiguador, se tritura el tejido hasta pulverizarlo.
- c.- Se adiciona el amortiguador en el volumen deseado sin dejar de triturar, generalmente una solución de  $K_2HPO_4$  0.05 M ajustado a un pH 8.8.
- d.- Se permite que el tejido absorba el amortiguador por 30 minutos.
- e.- Se tritura una vez más y el inóculo está listo.
- f.- El tejido seco restante se guarda en una bolsa plástica con cloruro de calcio o sulfato de calcio (materiales desecantes). La bolsa se sella y se almacena en el refrigerador o congelador.

**METODOLOGÍA DE TINCIÓN PARA MICROSCOPIA DE LUZ**

**I. Técnica con Orange Green:**

El colorante es una mezcla de Luxol Green y Orange G (8:1).

**Cuadro B.1** Procedimiento de tinción con Orange-Green.

CONTROL	MUESTRA	TIEMPO
1. Metilcellosolve	Metilcellosolve	indef. (mín 30 min)
2. -----	Tritón X-100	30 minutos
3. Colorante (O-G)	Colorante (O-G)	15 minutos
4. Etanol 95%	Etanol 95%	2-3 seg (sólo quitar exceso)
5. Acetato de etilenglicol	Acetato de etilenglicol	5-10 minutos
6. Quitar exceso	Quitar exceso	-----
7. Euparal-Vert (montar placas)	Euparal-Vert (montar placas)	-----

**II. Técnica con Azure A:**

El colorante es una mezcla de Azure A y una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M en proporción 9:1.

**Cuadro B.2** Procedimiento de tinción con Azure-A

CONTROL (sin calentar)	METODO 1 (calentando 60°)	METODO 2 (calentando 60°)
1. Metilcellosolve (t indef, mín 30')	Metilcellosolve (t indef, mín 30')	Metilcellosolve (t indef, mín 30')
2. Colorante (± 15') sin calor	Colorante y calor 60° C (± 2')	Colorante y calor 60° C (± 15')
3. Etanol 95% (2')	Etanol 95% (2')	Etanol 95% (2')
4. Acetato de etilenglicol (15')	Acetato de etilenglicol (15')	Acetato de etilenglicol (15')
5. Quitar exceso	Quitar exceso	Quitar exceso
6. Euparal-Vert (montar placas)	Euparal-Vert (montar placas)	Euparal-Vert (montar placas)

**METODOLOGÍA PARA LAS PRUEBAS DE ELISA**

**I. Descripción de los antisueros utilizados:**

**1. Antisuero para Bean Yellow Mosaic Potyvirus (BYMV)**

ATCC#: PVAS-368  
 CEPA: GDD (Golddigger D)  
 HUÉSPED DEL QUE SE PURIFICÓ EL VIRUS: *Nicotiana benthamiana*  
 ANIMAL DE PRUEBA USADO: Conejo  
 VIRUS SEROLÓGICAMENTE RELACIONADOS: CYVV, PMV, WaTV, TCBV,  
 TEV, TuMV, PeMV, PVY

**2. Antisuero para Clover Yellow Vein Potyvirus (CYVV)**

ATCC#: PVAS-123  
 CEPA: Pratt  
 HUÉSPED DEL QUE SE PURIFICÓ EL VIRUS: *Pisum sativum* cv.  
 Dwarf Grey Sugar (Arveja)  
 ANIMAL DE PRUEBA USADO: Conejo

**3. Antisuero para Pea Seed-borne Mosaic Virus (PSbMV)**

ATCC#: PVAS-184  
 CEPA: W-1  
 HUÉSPED DEL QUE SE PURIFICÓ EL VIRUS: *Pisum sativum* cv.  
 Alaska  
 ANIMAL DE PRUEBA USADO: Conejo

**4. Antisuero monoclonal para reacciones cruzadas de Potyvirus (PTY8)**

ATCC#: PVAS-767  
 HUÉSPED DEL QUE SE PURIFICÓ EL VIRUS: Varios  
 ANIMAL DE PRUEBA USADO: Ratón

**5. Antisuero para Cucumber Mosaic Virus (CMV)**

AGDIA#: G445  
 ANIMAL DE PRUEBA USADO: Conejo

**Antisuero conjugado con fosfatasa alcalina para CMV**

AGDIA#: EA445  
 ANIMAL DE PRUEBA USADO: Conejo

**6. Antisuero para Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)**

**Antisuero conjugado con peroxidasa para TSWV**  
 JUEGO PARA ELISA CON PEROXIDASA DE AGDIA PATHOSCREEN (5  
 placas cubiertas para 480 muestras)  
 HUÉSPED DEL QUE SE PURIFICÓ EL VIRUS: Lechuga

**7. Antisuero monoclonal conjugado con fosfatasa alcalina  
Anti-conejo**

SIGMA#: A-3687

ANIMAL DE PRUEBA USADO: Cabra

**8. Antisuero monoclonal conjugado con fosfatasa alcalina  
Anti-ratón**

SIGMA#: A-3562

ANIMAL DE PRUEBA USADO: Cabra

**II. Preparación de amortiguadores:**

Fue necesario preparar las siguientes soluciones:

**1. Buffer de Cobertura (pH 9.6)**

(Buffer carbonato 50 mM)

1.59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

2.93 g  $\text{NaHCO}_3$

0.20 g  $\text{NaN}_3$

Para 1 litro

**2. Buffer Fosfato Salino - PBS (pH 7.4)**

(Buffer fosfato salino 10 mM)

0.20 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2.90 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

8.00 g  $\text{NaCl}$

0.20 g  $\text{KCl}$

0.20 g  $\text{NaN}_3$

Para 1 litro

**3. Buffer de lavado - PBS Tween**

PBS Tween = PBS (1 litro) + 0.5 ml Tween 20

**4. Buffer de maceración (extracción)**

PBS Tween + 2% PVP + 1% albúmina de huevo (o leche descremada)

**5. Buffer de bloqueo**

PBS + 2% albúmina de huevo (o leche descremada)

**6. Buffer de conjugado**

PBS Tween + 1% albúmina de huevo (o leche descremada)

**7. Buffer sustrato (pH 9.8) 5X**

1 ml Dietanolamina

10 ml agua destilada

Ajustar a pH 9.8

**8. Solución de sustrato**

Se disuelve p-nitrofenilfosfato (PNP) en Buffer sustrato para llegar a una concentración de 0.6-1.0 mg/ml, se coloca en un frasco oscuro.

### III. Procedimiento para ELISA Directo:

1. Se cubrió la placa con el anticuerpo (IgG) diluido en **buffer de cobertura** (1-2  $\mu\text{g/ml}$ ). Agregando 100  $\mu\text{l}$ . por pozo, se incubó 3 a 4 horas a temperatura ambiente.
2. Se eliminó el contenido de la placa, se lavó con **buffer de lavado**, se dejó en reposo 3 minutos. El proceso se repitió 3 veces.
3. Se colocaron 100  $\mu\text{l}$ . de muestra en cada pozo en duplicado según el diseño. Se incubó la placa a 4°C durante toda la noche.
4. Se lavó la placa como en el paso (ii), teniendo cuidado que la placa quedara completamente transparente, sin restos de tejido.
5. Se diluyó el conjugado enzimático en **buffer de conjugado**, a una concentración óptima (1/1000). Se agregaron a cada pozo 100  $\mu\text{l}$ . Se incubó 2 horas a temperatura ambiente.
6. Se lavó la placa como en el paso (ii).
7. Se agregaron 100  $\mu\text{l}$ . de la **solución de sustrato** a cada pozo. Se incubó a temperatura ambiente por el tiempo necesario para observar la reacción (30 a 60 minutos).
8. Se hicieron las observaciones visuales para resultados **cualitativos**, y las lecturas de absorbancia a 405 nm para resultados **cuantitativos**.

### IV. Procedimiento para ELISA Indirecto:

1. Se colocaron 50  $\mu\text{l}$ . de cada muestra directamente en la placa, en duplicado según el diseño preparado. Se incubó la placa a 4°C durante toda la noche.
2. Se lavó la placa con **buffer de lavado**, se dejó reposar por 3 minutos, se repitió el proceso 3 veces.
3. Se agregaron 100  $\mu\text{l}$ . por pozo de **buffer de bloqueo**. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente.
4. Se lavó la placa como en el paso (ii).
5. Se agregaron 50  $\mu\text{l}$ . del anticuerpo específico diluido en **buffer de conjugado** a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Se incubó 2 horas a temperatura ambiente.



## APÉNDICE D

## MUESTREO EN EL CAMPO

**Tabla D.1** Descripción de las plantaciones muestreadas en el campo.

Fecha de muestreo	No. corr. <sup>a</sup>	Variedad	No. Ident. <sup>b</sup>	Localidad	Características	Presencia de Síntomas
12-7-93	1	Enana	010793	Saqiyá, Patzún, Chimaltenango	Terreno inclinado muchas malezas	No se encontraron
12-7-93	2	Gigante	020793	Los Pitos, Patzún, Chimaltenango	Exceso aplicación pesticidas	No se encontraron
12-7-93	3	Gigante	030793	Patzún, Chimaltenango	Bastante sana	No se encontraron
12-7-93	4	Enana	040793	San Lorenzo, Tecpán, Chimalt.	Muchas malezas Afidos presentes	No se encontraron
12-7-93	5	Enana	050793	Xenimajuyú, Tecpán, Chimalt.	Bastante sana	No se encontraron
12-7-93	6	Enana	060793	Xenimajuyú, Tecpán, Chimalt.	Bastante sana	No se encontraron
12-7-93	7	Enana	070793	Camán, Patzicia, Chimaltenango	Falta manejo, no limpias ni pestic.	No se encontraron
12-7-93	8	Enana	080793	Sta. María Cauqué Sacatepéquez	Falta manejo, no limpias ni pestic.	No se encontraron
11-10-93	9	Enana	011093	Sta. María Cauqué Sacatepéquez	Falta manejo, no limpias ni pestic.	No se encontraron
11-10-93	10	Enana	021093	Chirijuyú, Tecpán, Chimaltenango	Vecina a trigo, bastante sana	No se encontraron
11-10-93	11	Mediana	031093	Chirijuyú, Tecpán, Chimaltenango	Buen manejo, bastante sana	No se encontraron
11-10-93	12	Mediana	041093	Chirijuyú, Tecpán, Chimaltenango	Falta manejo, no limpias ni pestic.	No se encontraron
11-10-93	13	Enana	051093	Chirijuyú, Tecpán, Chimaltenango	Falta manejo, no limpias ni pestic.	No se encontraron
20-12-93	14	Enana	A 1293	Chimasat, Santa Cruz Balanyá, Chimaltenango	Siembras pasadas: maíz, frijol, güicoy	Sínt. claros de mosaico y atrofia <sup>c</sup>
20-12-93	15	Gigante	B 1293	Chimasat, Santa Cruz Balanyá, Chimaltenango	Primera siembra de arveja china	Sínt. claros de mosaico y atrofia <sup>c</sup>
20-12-93	16	Gigante	C 1293	Chimasat Sta. Cruz Balanyá, Chimalt.	Inicio de cosecha Plantas adultas	No se encontraron
20-12-93	17	Enana	D 1293	Chimasat Sta. Cruz Balanyá, Chimalt.	Bastante sana	No se encontraron
20-12-93	18	Enana	E 1293	Patzicia, Chimaltenango	Bastante sana	No se encontraron

Tabla D.1 Continuación.

Fecha de muestreo	No. corr. <sup>a</sup>	Variedad	No. Ident. <sup>b</sup>	Localización	Características	Presencia de Síntomas
20-12-93	19	Enana	F 1293	El Tejar, Chimaltenango	Falta manejo. Vecindad chile con mosca blanca y síntomas de virus	No se encontraron
20-12-93	20	Enana	G 1293	Sumpango Sacatepéquez	Bastante sana	No se encontraron
8-3-94	21	Gigante	H 0394	Santa Apolonia, Chimaltenango	Con riego. Plantas en floración	No se encontraron
8-3-94	22	Dulce	I 0394	Santa Apolonia, Chimaltenango	Con riego. Plantas en floración	No se encontraron
8-3-94	23	Enana	J 0394	Santa Apolonia, Chimaltenango	Con riego. Plantas en floración	No se encontraron
13-9-94	24	Dulce	K 0994	Zaragoza, Chimaltenango	Falta manejo, no limpias ni pestic. Vecina plant. haba	No se encontraron
11-11-94	25	Enana	L 1194	Joya Grande, Zaragoza, Chimaltenango	Plantación en floración	Sínt. claros de mosaico y atrofia <sup>c</sup>
11-11-94	26	Enana	M1194	Joya Grande, Zaragoza, Chimaltenango	Plantación en floración	Sínt. claros de mosaico y atrofia <sup>c</sup>
11-11-94	27	Enana	N1194	Joya Grande, Zaragoza, Chimaltenango	Plantación en floración	Sínt. claros de mosaico y atrofia <sup>c</sup>

**Notas:**

Chimalt. = Chimaltenango

<sup>a</sup> Número correlativo de la plantación.<sup>b</sup> Clave para identificación de la plantación.<sup>c</sup> Síntomas sobre hojas jóvenes, mosaico bien marcado. Plantas un tanto atrofiadas y reducidas de tamaño. Daño más severo en plantas Oregon Sugar Pod II que en las Melting Sugar.

## APÉNDICE E

## REGISTRO DE MUESTRAS PROCESADAS EN EL LABORATORIO

**TABLA E.1.** Listado general de muestras del campo procesadas en el laboratorio.

Identificación de la muestra	Descripción	No. de paquetes desecados
010793	No sintomática	6
020793	No sintomática	14
030793	No sintomática	16
040793	No sintomática	11
050793	No sintomática	6
060793	No sintomática	12
070793	No sintomática	1
080793	No sintomática	5
011093	No sintomática	6
021093	No sintomática	11
031093	No sintomática	14
041093	No sintomática	6
051093	No sintomática	1
A1293	No sintomática	3
AS1293	Con síntomas de mosaico fuerte y bien definido (S)	11
ASV1293	Síntomas suaves de mosaico con aclareamiento de venas (SV)	2
ASA1293	Síntomas no bien definidos. Síntomas aparentes (SA)	2
BS1293	Con síntomas de mosaico fuerte y bien definido (S)	7
BSV1293	Síntomas suaves de mosaico con aclareamiento de venas (SV)	4
C1293	No sintomática	3
D1293	No sintomática	6
DSA1293	Síntomas no bien definidos. Síntomas aparentes (SA)	1
E1293	No sintomática	4
F1293	No sintomática	5
G1293	No sintomática	3
H0394	No sintomática	11
HSA0394	Síntomas no bien definidos. Síntomas aparentes (SA)	4
J0394	No sintomática	12
K0994	No sintomática	5
LS1194	Con síntomas de mosaico fuerte y bien definido (S)	10
LSV1194	Síntomas suaves de mosaico con aclareamiento de venas (SV)	12
LSA1194	Síntomas no bien definidos. Síntomas aparentes (SA)	12
LSF1194	Flores de plantas con síntomas de mosaico fuerte y definido (S)	3
MS1194	Con síntomas de mosaico fuerte y bien definido (S)	7
MSV1194	Síntomas suaves de mosaico con aclareamiento de venas (SV)	3
MSA1194	Síntomas no bien definidos. Síntomas aparentes (SA)	11
NS1194	Con síntomas de mosaico fuerte y bien definido (S)	29
NSV1194	Síntomas suaves de mosaico con aclareamiento de venas (SV)	6

**TABLA E.1.** Continuación.

Identificación de la muestra	Descripción	No. de paquetes desecados
NSA1194	Síntomas no bien definidos. Síntomas aparentes (SA)	2
NSF1194	Flores de plantas con síntomas de mosaico fuerte y definido (S)	3
NSAMV1194	Síntomas suaves y aparentes. Manchas verdes oscuras (SAMV)	8
NN1194	Plantas cercanas a las infectadas y no sintomáticas (Normales)	7
NSSV1194	Síntomas fuertes y evidentes además, aclareo de venas (SSV)	9
	<b>TOTAL MUESTRAS DEL CAMPO PROCESADAS</b>	<b>43 (y un total de 314 submuestras)</b>

## APÉNDICE F

## RESULTADOS BRUTOS DE LAS PRUEBAS DE ELISA

En todas las tablas de este apéndice aparecen abreviaturas que deben interpretarse así:

No. Rep = Número de repeticiones de la muestra en la placa.

Abs  $\bar{Y}$  = Absorbancia promedio de las repeticiones, y los diferentes tiempos utilizados.

Res. = Resultado; Pos= Positivo; Neg= Negativo.

**TABLA F.1.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas para CMV. Diciembre de 1994. PLACA No.1.

Muestra	No. Rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res.	Muestra	No. Rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res.
<b>Control Positivo</b>	<b>4</b>	<b>1.190</b>	<b>Pos</b>	011093	2	0.010	Neg
BLANCO	4	0.020	Neg	021093	2	0.015	Neg
020793	2	0.000	Neg	031093	2	0.010	Neg
030793	2	0.005	Neg	041093	2	0.005	Neg
040793	2	0.005	Neg	051093	2	0.010	Neg
050793	2	0.005	Neg	051093SA	2	0.005	Neg
060793	2	0.010	Neg	A1293	2	0.020	Neg
070793	2	0.015	Neg	AS1293	2	0.015	Neg
080793	2	0.055	Neg	ASV1293	2	0.000	Neg

**TABLA F.2.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas para CMV. Diciembre de 1994. PLACA No.2.

Muestra	No. Rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res.	Muestra	No. Rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res.
<b>Control positivo</b>	<b>4</b>	<b>1.180</b>	<b>Pos</b>	K0994 (haba)	2	0.100	<b>Pos</b>
BLANCO	4	0.005	Neg	LS1194	2	0.000	Neg
B1293	2	0.000	Neg	LSV1194	2	0.005	Neg
BS1293	2	0.000	Neg	LSA1194	2	0.005	Neg
C1293	2	0.000	Neg	LSF1194	2	0.000	Neg
D1293	2	0.020	Neg	MS1194	2	0.000	Neg
E1293	2	0.000	Neg	MSV1194	2	0.000	Neg
F1293	2	0.000	Neg	MSA1194	2	0.000	Neg
G1293	2	0.010	Neg	NS1194	2	0.000	Neg
H0394	2	0.000	Neg	NSV1194	2	0.000	Neg
HSA0394	2	0.000	Neg	NSA1194	2	0.000	Neg
J0394	2	0.000	Neg	NSAMV1194	2	0.010	Neg
JSA0394	2	0.000	Neg	NSSV1194	2	0.000	Neg
K0994	2	0.000	Neg	NN1194	2	0.000	Neg

**TABLA F.3.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas para TSWV. Noviembre de 1994. PLACA No.1.

Muestra	No. Rep	Abs $\bar{Y}$ 60 min	Res.	Muestra	No. Rep	Abs $\bar{Y}$ 60 min	Res.
<b>Control Positivo</b>	<b>4</b>	<b>1.560</b>	<b>Pos</b>	031093	2	0.000	Neg
BLANCO	4	0.013	Neg	041093	2	0.000	Neg
010793	2	0.035	Neg	051093	2	0.000	Neg
020793	2	0.000	Neg	051093SA	2	0.000	Neg
030793	2	0.000	Neg	A1293	2	0.000	Neg
040793	2	0.005	Neg	AS1293	2	0.000	Neg
050793	2	0.000	Neg	ASV1293	2	0.010	Neg
070793	2	0.000	Neg	B1293	2	0.000	Neg
080793	2	0.000	Neg	BS1293	2	0.000	Neg
011093	2	0.010	Neg	C1293	2	0.000	Neg
021093	2	0.000	Neg	D1293	2	0.020	Neg

**TABLA F.4.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas para TSWV. Diciembre de 1994. PLACA No.2.

Muestra	No. Rep	Abs $\bar{Y}$ 30 min	Res	Muestra	No. Rep	Abs $\bar{Y}$ 30 min	Res
<b>Control Positivo</b>	<b>4</b>	<b>0.870</b>	<b>Pos</b>	LSV1194	2	0.010	Neg
BLANCO	4	0.013	Neg	LSA1194	2	0.010	Neg
E1293	2	0.015	Neg	LSF1194	2	0.040	Neg
F1293	2	0.015	Neg	MS1194	4	0.010	Neg
G1293	2	0.020	Neg	MSV1194	2	0.010	Neg
H0394	2	0.005	Neg	MSA1194	2	0.030	Neg
HSA0394	2	0.010	Neg	NS1194	4	0.008	Neg
J0394	2	0.000	Neg	NSV1194	2	0.015	Neg
JSA0394	2	0.005	Neg	NSA1194	2	0.010	Neg
K0994	2	0.015	Neg	NSAMV1194	2	0.010	Neg
K0994 (hab)	2	0.010	Neg	NSSV1194	2	0.020	Neg
LS1194	4	0.005	Neg	NN1194	2	0.020	Neg

**TABLA F.5.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas para PSbMV. Agosto de 1995. PLACA No.1.

Muestra	No. Rep	Abs $\bar{Y}$ 60 min	Res	Muestra	No. Rep	Abs $\bar{Y}$ 60 min	Res
<b>Control Positivo</b>	<b>2</b>	<b>0.890</b>	<b>Pos</b>	041093 (6)	2	0.020	Neg
BLANCO	4	0.000	Neg	051093 (1)	2	0.000	Neg
010793 (5)	2	0.015	Neg	A1293 (2)	2	0.000	Neg
010793 (6)	2	0.010	Neg	A1293 (3)	2	<b>0.175</b>	<b>Pos</b>
020793 (6)	2	0.040	Neg	AS1293 (8)	2	0.095	Neg
020793(14)	2	0.005	Neg	AS1293(10)	2	0.025	Neg
030793(11)	2	0.000	Neg	ASV1293(1)	2	<b>0.150</b>	<b>Pos</b>
030793(13)	2	0.010	Neg	ASV1293(2)	2	<b>0.195</b>	<b>Pos</b>
040793 (5)	2	0.005	Neg	ASA1293(1)	2	0.000	Neg
040793 (9)	2	0.000	Neg	ASA1293(2)	2	0.005	Neg
050793 (2)	2	0.000	Neg	BS1293 (3)	2	<b>0.170</b>	<b>Pos</b>
050793 (6)	2	0.040	Neg	BS1293 (6)	2	<b>0.205</b>	<b>Pos</b>
060793 (4)	2	0.010	Neg	BSV1293(2)	2	<b>0.320</b>	<b>Pos</b>
060793(12)	2	0.015	Neg	BSV1293(3)	2	<b>0.175</b>	<b>Pos</b>
080793 (2)	2	0.005	Neg	C1293 (1)	2	0.025	Neg
080793 (5)	2	0.020	Neg	C1293 (3)	2	0.075	Neg
011093 (2)	2	0.020	Neg	D1293 (3)	2	0.010	Neg
011093 (4)	2	0.035	Neg	D1293 (6)	2	0.010	Neg
021093 (3)	2	0.025	Neg	DSA1293(1)	2	<b>0.145</b>	<b>Pos</b>
021093 (4)	2	0.000	Neg	E1293 (1)	2	0.050	Neg
031093 (7)	2	0.000	Neg	E1293 (3)	2	0.015	Neg
031093(10)	2	0.020	Neg	F1293 (4)	2	0.025	Neg
041093 (2)	2	0.010	Neg	-----	-	-----	---

**TABLA F.6.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas para PSbMV. Agosto de 1995. PLACA No. 2.

Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res	Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res
<b>Control Positivo</b>	<b>2</b>	<b>0.850</b>	<b>Pos</b>	MS1194 (1)	2	<b>0.160</b>	<b>Pos</b>
BLANCO	4	0.000	Neg	MS1194 (4)	2	<b>0.115</b>	<b>Pos</b>
F1293 (2)	2	0.000	Neg	MSV1194 (1)	2	0.050	Neg
G1293 (1)	2	0.010	Neg	MSV1194 (2)	2	<b>0.180</b>	<b>Pos</b>
G1293 (3)	2	0.000	Neg	MSA1194 (2)	2	0.015	Neg
H0394 (4)	2	0.050	Neg	MSA1194 (6)	2	0.000	Neg
H0394 (7)	2	0.005	Neg	NS1194 (3)	2	<b>0.230</b>	<b>Pos</b>
HSA0394(2)	2	0.005	Neg	NS1194 (19)	2	<b>0.155</b>	<b>Pos</b>
HSA0394(4)	2	0.005	Neg	NSV1194 (3)	2	<b>0.220</b>	<b>Pos</b>

TABLA F.6. Continuación.

Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res	Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res
J0394 (1)	2	0.050	Neg	NSV1194 (6)	2	0.010	Neg
J0394 (3)	2	0.015	Neg	NSA1194 (1)	2	0.040	Neg
K0994 (1)	2	0.030	Neg	NSA1194 (2)	2	0.020	Neg
K0994 (4)	2	0.010	Neg	NSF1194 (2)	2	<b>0.130</b>	<b>Pos</b>
LS1194 (1)	2	<b>0.140</b>	<b>Pos</b>	NSF1194 (3)	2	0.020	Neg
LS1194 (2)	2	0.055	Neg	NSAMV1194 (2)	2	<b>0.160</b>	<b>Pos</b>
LSV1194 (2)	2	<b>0.210</b>	<b>Pos</b>	NSAMV1194 (6)	2	<b>0.170</b>	<b>Pos</b>
LSV1194 (9)	2	<b>0.270</b>	<b>Pos</b>	NSSV1194 (2)	2	0.040	Neg
LSF1194 (2)	2	<b>0.070</b>	<b>Pos</b>	NSSV1194 (8)	2	<b>0.070</b>	<b>Pos</b>
LSF1194 (3)	2	<b>0.070</b>	<b>Pos</b>	NN1194 (2)	2	0.000	Neg
LSA1194 (1)	2	0.010	Neg	NN1194 (5)	2	0.020	Neg
LSA1194 (7)	2	0.015	Neg	SNOW FLAKE	2	0.005	Neg

TABLA F.7. Resultados de las pruebas de ELISA corridas para CYVV. Agosto de 1995. PLACA No. 1.

Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res	Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res
<b>Control Positivo</b>	<b>2</b>	<b>1.100</b>	<b>Pos</b>	041093 (6)	2	0.095	Neg
BLANCO	4	0.008	Neg	051093 (1)	2	0.090	Neg
010793 (5)	2	0.095	Neg	A1293 (2)	2	0.135	Neg
010793 (6)	2	0.110	Neg	A1293 (3)	2	0.155	Neg
020793 (6)	2	0.125	Neg	AS1293 (8)	2	<b>0.375</b>	<b>Pos</b>
020793 (14)	2	0.100	Neg	AS1293 (10)	2	<b>0.420</b>	<b>Pos</b>
030793 (11)	2	0.080	Neg	ASV1293 (1)	2	<b>0.610</b>	<b>Pos</b>
030793 (13)	2	0.120	Neg	ASV1293 (2)	2	<b>0.485</b>	<b>Pos</b>
040793 (5)	2	0.130	Neg	ASA1293 (1)	2	0.140	Neg
040793 (9)	2	0.115	Neg	ASA1293 (2)	2	0.140	Neg
050793 (2)	2	0.120	Neg	BS1293 (3)	2	<b>0.460</b>	<b>Pos</b>
050793 (6)	2	0.145	Neg	BS1293 (6)	2	<b>0.435</b>	<b>Pos</b>
060793 (4)	2	0.090	Neg	BSV1293 (2)	2	<b>0.415</b>	<b>Pos</b>
060793 (12)	2	0.080	Neg	BSV1293 (3)	2	<b>0.440</b>	<b>Pos</b>
080793 (2)	2	0.080	Neg	C1293 (1)	2	0.170	Neg
080793 (5)	2	0.095	Neg	C1293 (3)	2	0.120	Neg
011093 (2)	2	0.185	Neg	D1293 (3)	2	0.170	Neg
011093 (4)	2	0.115	Neg	D1293 (6)	2	0.165	Neg
021093 (3)	2	0.090	Neg	DSA1293 (1)	2	<b>0.700</b>	<b>Pos</b>
021093 (4)	2	0.085	Neg	E1293 (1)	2	0.195	Neg
031093 (7)	2	0.110	Neg	E1293 (3)	2	0.120	Neg
031093 (10)	2	0.130	Neg	F1293 (4)	2	0.130	Neg
041093 (2)	2	0.115	Neg	-----	-	-----	---

**TABLA F.8.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas para CYVV. Agosto de 1995. PLACA No. 2.

Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res	Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res
<b>Control positivo</b>	<b>2</b>	<b>0.910</b>	<b>Pos</b>	Arv. Oregon inoc. CYVV	2	<b>0.550</b>	<b>Pos</b>
BLANCO	4	0.000	Neg	MS1194 (4)	2	<b>0.310</b>	<b>Pos</b>
F1293 (2)	2	0.005	Neg	MSV1194 (1)	2	0.190	Neg
G1293 (1)	2	0.025	Neg	MSV1194 (2)	2	<b>0.220</b>	<b>Pos</b>
G1293 (3)	2	0.020	Neg	MSA1194 (2)	2	0.000	Neg
H0394 (4)	2	0.020	Neg	MSA1194 (6)	2	0.020	Neg
H0394 (7)	2	0.005	Neg	NS1194 (3)	2	<b>0.470</b>	<b>Pos</b>
HSA0394(2)	2	0.015	Neg	NS1194 (19)	2	<b>0.285</b>	<b>Pos</b>
HSA0394(4)	2	0.010	Neg	NSV1194 (3)	2	<b>0.305</b>	<b>Pos</b>
J0394 (1)	2	0.055	Neg	NSV1194 (6)	2	0.020	Neg
J0394 (3)	2	0.055	Neg	NSA1194 (1)	2	<b>0.220</b>	<b>Pos</b>
K0994 (1)	2	0.020	Neg	NSA1194 (2)	2	0.095	Neg
K0994 (4)	2	0.000	Neg	NSF1194 (2)	2	<b>0.205</b>	<b>Pos</b>
LS1194 (1)	2	<b>0.250</b>	<b>Pos</b>	NSF1194 (3)	2	0.170	Neg
LS1194 (2)	2	0.180	Neg	NSAMV1194(2)	2	<b>0.265</b>	<b>Pos</b>
LSV1194(2)	2	<b>0.395</b>	<b>Pos</b>	NSAMV1194(6)	2	<b>0.445</b>	<b>Pos</b>
LSV1194(9)	2	<b>0.365</b>	<b>Pos</b>	NSSV1194 (2)	2	<b>0.205</b>	<b>Pos</b>
LSF1194(2)	2	<b>0.280</b>	<b>Pos</b>	NSSV1194 (8)	2	<b>0.265</b>	<b>Pos</b>
LSF1194(3)	2	<b>0.245</b>	<b>Pos</b>	NN1194 (2)	2	0.105	Neg
LSA1194(1)	2	0.000	Neg	NN1194 (5)	2	0.140	Neg
LSA1194(7)	2	0.005	Neg	SNOW FLAKE	2	0.080	Neg
MS1194 (1)	2	<b>0.210</b>	<b>Pos</b>	-----	-	-----	---

**TABLA F.9.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas para BYMV. Octubre de 1995. PLACA No. 1.

Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 30min	Res	Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 30min	Res
<b>Control Positivo</b>	<b>2</b>	<b>0.60</b>	<b>Pos</b>	ASV1293(1)	2	<b>0.600</b>	<b>Pos</b>
BLANCO	4	0.025	Neg	ASV1293(2)	2	<b>0.590</b>	<b>Pos</b>
010793 (3)	2	0.205	Neg	BS1293 (5)	2	<b>0.570</b>	<b>Pos</b>
010793 (4)	2	0.160	Neg	BS1293 (7)	2	<b>0.555</b>	<b>Pos</b>
020793 (7)	2	0.135	Neg	C1293 (2)	2	0.165	Neg
020793(14)	2	0.115	Neg	C1293 (3)	2	0.130	Neg
030793 (5)	2	0.110	Neg	DSA1293(1)	2	<b>0.600</b>	<b>Pos</b>
030793(12)	2	0.135	Neg	E1293 (3)	2	0.160	Neg
040793 (4)	2	0.185	Neg	E1293 (4)	2	0.165	Neg
040793 (8)	2	0.130	Neg	F1293 (1)	2	0.185	Neg

TABLA F.9. Continuación.

Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 30min	Res	Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 30min	Res
011093 (1)	2	0.170	Neg	F1293 (4)	2	0.160	Neg
011093 (4)	2	0.140	Neg	HSA0394 (2)	2	0.120	Neg
021093 (1)	2	0.210	Neg	HSA0394 (3)	2	0.140	Neg
021093 (4)	2	0.170	Neg	LS1194 (2)	2	<b>0.560</b>	<b>Pos</b>
051093 (1)	2	0.170	Neg	LS1194 (3)	2	<b>0.560</b>	<b>Pos</b>
A1293 (2)	2	0.220	Neg	LSV1194 (4)	2	<b>0.600</b>	<b>Pos</b>
A1293 (3)	2	0.180	Neg	LSV1194 (7)	2	<b>0.565</b>	<b>Pos</b>
AS1293 (2)	2	<b>0.585</b>	<b>Pos</b>	LSF1194 (2)	2	<b>0.590</b>	<b>Pos</b>
AS1293 (8)	2	<b>0.555</b>	<b>Pos</b>	LSF1194 (3)	2	<b>0.580</b>	<b>Pos</b>

TABLA F.10. Resultados de las pruebas de ELISA corridas para BYMV. Octubre de 1995. PLACA No. 2.

Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res	Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res
<b>Control Positivo</b>	<b>2</b>	<b>0.600</b>	<b>Pos</b>	J0394 (6)	2	0.075	Neg
BLANCO	4	0.0025	Neg	ASA1293 (1)	2	0.245	Neg
050793 (2)	2	0.240	Neg	ASA1293 (2)	2	0.180	Neg
050793 (4)	2	0.175	Neg	BSV1293 (1)	2	<b>0.600</b>	<b>Pos</b>
060793 (2)	2	0.085	Neg	BSV1293 (4)	2	<b>0.570</b>	<b>Pos</b>
060793 (9)	2	0.320	Neg	LSA1194 (1)	2	0.195	Neg
080793 (2)	2	0.190	Neg	LSA1194 (5)	2	0.110	Neg
080793 (5)	2	0.190	Neg	MS1194 (3)	2	<b>0.600</b>	<b>Pos</b>
031093 (7)	2	0.145	Neg	MS1194 (5)	2	<b>0.600</b>	<b>Pos</b>
031093 (13)	2	0.105	Neg	MSV1194 (2)	2	<b>0.570</b>	<b>Pos</b>
041093 (1)	2	0.215	Neg	MSV1194 (3)	2	<b>0.595</b>	<b>Pos</b>
041093 (6)	2	0.225	Neg	MSA1194 (5)	2	0.295	Neg
D1293 (2)	2	0.150	Neg	MSA1194 (7)	2	0.175	Neg
D1293 (5)	2	0.105	Neg	NSV1194 (1)	2	<b>0.600</b>	<b>Pos</b>
G1293 (1)	2	0.175	Neg	NSV1194 (5)	2	<b>0.530</b>	<b>Pos</b>
G1293 (2)	2	0.160	Neg	NSA1194 (1)	2	<b>0.515</b>	<b>Pos</b>
H0394 (1)	2	0.185	Neg	NSA1194 (2)	2	<b>0.465</b>	<b>Pos</b>
H0394 (7)	2	0.135	Neg	NSF1194 (2)	2	<b>0.600</b>	<b>Pos</b>
J0394 (3)	2	0.110	Neg	NSF1194 (3)	2	<b>0.600</b>	<b>Pos</b>

**TABLA F.11.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas para BYMV. Octubre de 1995. PLACA No. 3.

Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res	Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 60min	Res
<b>Control Positivo</b>	2	0.600	Pos	NN1194(1)	2	0.515	Pos
BLANCO	4	0.210	Neg	NN1194(6)	2	0.305	Pos
K0994 (1)	2	0.210	Neg	<b>AS</b> iArv19	2	0.600	Pos
K0994 (5)	2	0.185	Neg	<b>ASi</b> Haba23	2	0.600	Pos
NS1194 (8)	2	0.600	Pos	<b>ASVi</b> Frj20	2	0.390	Pos
NS1194 (28)	2	0.600	Pos	<b>ASVi</b> Hab22	2	0.600	Pos
NSAMV1194(2)	2	0.600	Pos	<b>BS</b> iArv19	2	0.600	Pos
NSAMV1194(5)	2	0.275	Pos	<b>MS</b> iFrj20	2	0.335	Pos
NSSV1194 (2)	2	0.600	Pos	<b>NS</b> iArv18	2	0.600	Pos
NSSV1194 (7)	2	0.600	Pos	<b>NS</b> iFrj20	2	0.365	Pos

**TABLA F.12.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas con el antisuero monoclonal PTY8 en febrero de 1996. PLACA No. 1.

Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 20min	Res	Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 20min	Res
<b>C+ BYMV</b>	2	0.320	Pos	BSV1293 (3)	2	0.270	Pos
<b>C+ CYVV</b>	2	0.050	Neg	BSV1293 (4)	2	0.295	Pos
<b>C+ PMV</b>	2	0.245	Pos	DSA1293 (1)	2	0.310	Pos
<b>C+ PSbMV</b>	2	0.060	Neg	LS1194 (1)	2	0.200	Pos
AS1293 (2)	2	0.325	Pos	LS1194 (2)	2	0.205	Pos
AS1293 (8)	2	0.260	Pos	LS1194 (3)	2	0.200	Pos
AS1293(10)	2	0.240	Pos	LSV1194 (2)	2	0.315	Pos
ASV1293(2)	2	0.295	Pos	LSV1194 (4)	2	0.290	Pos
BS1293 (3)	2	0.275	Pos	LSV1194 (7)	2	0.225	Pos
BS1293 (5)	2	0.285	Pos	LSV1194 (9)	2	0.290	Pos
BS1293 (6)	2	0.300	Pos	LSF1194 (2)	2	0.255	Pos
BS1293 (7)	2	0.260	Pos	NSSV1194(2)	2	0.090	Pos
BSV1293(1)	2	0.305	Pos	NN1194 (1)	2	0.105	Pos
BSV1293(2)	2	0.275	Pos	NN1194 (6)	2	0.130	Pos

**TABLA F.13.** Resultados de las pruebas de ELISA corridas con el antisuero monoclonal PTY8 en febrero de 1996. PLACA No. 2.

Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 20min	Res	Muestra	No. rep	Abs $\bar{Y}$ 20min	Res
C+ BYMV	2	0.320	Pos	NSV1194 (1)	2	0.320	Pos
C+ CYVV	2	0.075	Neg	NSV1194 (3)	2	0.250	Pos
C+ PMV	2	0.250	Pos	NSV1194 (5)	2	0.215	Pos
C+ PSbMV	2	0.080	Neg	NSV1194 (6)	2	0.190	Pos
LSF1194(3)	2	0.255	Pos	NSA1194 (1)	2	0.255	Pos
MS1194 (1)	2	0.320	Pos	NSA1194 (2)	2	0.190	Pos
MS1194 (3)	2	0.315	Pos	NSF1194 (2)	2	0.265	Pos
MS1194 (4)	2	0.320	Pos	NSF1194 (3)	2	0.110	Pos
MS1194 (5)	2	0.300	Pos	NSAMV1194(2)	2	0.225	Pos
MSV1194(1)	2	0.315	Pos	NSAMV1194(5)	2	0.030	Neg
MSV1194(2)	2	0.185	Pos	NSAMV1194(6)	2	0.270	Pos
MSV1194(3)	2	0.260	Pos	NN1194 (2)	2	0.080	Neg
NS1194 (3)	2	0.320	Pos	NN1194 (5)	2	0.090	Neg
NS1194 (8)	2	0.235	Pos	NSSV1194 (7)	2	0.165	Pos
NS1194(19)	2	0.320	Pos	NSSV1194 (8)	2	0.260	Pos
NS1194(28)	2	0.295	Pos	ACH1293 (1)	2	0.075	Neg

**TABLA F.14.** Puntos de corte calculados para cada una de las pruebas de ELISA corridas.

No.	Virus analizado	No. de placa	Punto de corte
1	Cucumber Mosaic Virus (CMV)	1	0.060
2	Cucumber Mosaic Virus (CMV)	2	0.030
3	Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)	1	0.050
4	Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)	2	0.050
5	Pea Seedborne Mosaic Virus (PSbMV)	1	0.110
6	Pea Seedborne Mosaic Virus (PSbMV)	2	0.070
7	Clover Yellow Vein Virus (CYVV)	1	0.240
8	Clover Yellow Vein Virus (CYVV)	2	0.190
9	Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV)	1	0.280
10	Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV)	2	0.340
11	Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV)	3	0.240
12	PTY8 (Reacciones cruzadas Potyvirus)	1	0.075
13	PTY8 (Reacciones cruzadas Potyvirus)	2	0.110