

*BUSCA DE FUENTES DE RESISTENCIA
Y METODOS DE DIAGNOSIS AL VIRUS DEL MOSAICO EN
CARDAMOMO.*

**BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Te
B72

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

*Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Ciencias Agrícolas*

*BUSCA DE FUENTES DE RESISTENCIA
Y METODOS DE DIAGNOSIS AL VIRUS DEL MOSAICO EN
CARDAMOMO*

OSCAR DAVID BONILLA AGUIRRE

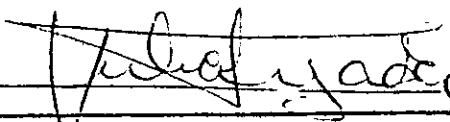
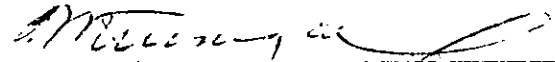
*Trabajo de investigación presentado
para optar el grado académico de
Licenciado en Ciencias Agrícolas*

Guatemala

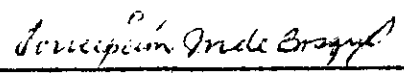
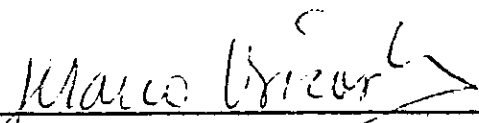
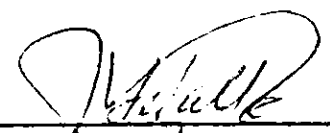
1983

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Vo. Bo. :

- (f) 
Ingeniero Julio R. Tejada
Asesor
- (f) 
Ingeniero Marco T. Urizar
Director Depto. Ciencias Agrícolas

Tribunal:

- (f) 
Lcda. Concepción M. de Bosque
- (f) 
Lic. Marco Urizar Montorieff
- (f) 
Ing. Manuel del Valle

Fecha de aprobación: 18 de noviembre de 1983.

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

A mis padres

A mis abuelos

A mi familia

A mis profesores

A mis amigos

AGRADECIMIENTO

Lo hago patente de forma muy sincera a:

La Asociación de Productores de Cardamomo (APROCAR) por su interés, ayuda y soporte económico del estudio.

Dr. Dennis Gonsalves por su transmisión en el conocimiento de la técnica ELISA.

Los Ingenieros Julio R. Tejada y Marco T. Urizar, Lic. Marco T. Urizar Monterieff por su ayuda tan franca y desinteresada.

El extensionista del proyecto APROCAR-UVG, Rolando Mejía por su trabajo.

A mis compañeros de laboratorio.

A la Universidad del Valle por haber prestado sus instalaciones y equipo.

Y finalmente, a todas aquellas personas que intervinieron en la realización del presente estudio.

RESUMEN

La resistencia varietal es la mejor forma de combatir las enfermedades virales. Con el propósito de encontrar alguna línea que posea los genes de resistencia, que puedan ser utilizados en un futuro para mejoramiento del cardamomo. Se han hecho intentos de obtener plantas que sirvan como fuentes de resistencia al Virus del mosaico del cardamomo.

Las plantas aparentemente sanas fueron seleccionadas en cultivos de alta incidencia de esta enfermedad. Se recolectaron y evaluaron bajo condiciones de presión de selección natural por dos métodos serológicos: El ELISA-directo y el indirecto. Se encontró una correlación extremadamente alta entre ambos métodos y los síntomas visuales en vivero de evaluación de susceptibilidad.

De un total de 54 líneas, seleccionadas a nivel de campo y evaluadas en vivero después de ocho meses de inoculación natural, presentaron un grado nulo de infección 24 de ellas.

También se utilizó el método ELISA-indirecto como instrumento de diagnóstico en plántulas de viveros comerciales, dando como resultado una muy buena sensibilidad en muestras compuestas de un grupo de submuestras. Lo que representa una mayor confiabilidad debida al tamaño de la muestra y un ahorro de reactivos y tiempo, lo cual es de gran importancia.

CONTENIDO

	<i>Página</i>
<i>RESUMEN</i>	
<i>I. INTRODUCCION</i>	<i>1</i>
<i>II. REVISION DE LITERATURA</i>	<i>4</i>
<i>A. El cultivo del cardamomo</i>	<i>4</i>
<i>B. La enfermedad del mosaico del cardamomo</i>	<i>10</i>
<i>C. Técnicas serológicas en el diagnóstico de virus en plantas</i>	<i>11</i>
<i>D. La técnica inmunosorbente enzima conjugada (ELISA)</i>	<i>12</i>
<i>E. Resistencia varietal de plantas a enfermedades virales</i>	<i>15</i>
<i>III. MATERIALES Y METODOS</i>	<i>19</i>
<i>A. Reactivos</i>	<i>19</i>
<i>B. Procedimiento de la técnica ELISA</i>	<i>19</i>
<i>C. Purificación de la gama-globulina</i>	<i>27</i>
<i>D. Conjugación de la enzima fosfatasa con la gama-globulina</i>	<i>28</i>
<i>E. Preparación de las muestras para analizar con ELISA</i>	<i>29</i>
<i>F. Selección del material de cardamomo en plantaciones con alta incidencia al Virus del mosaico del cardamomo</i>	<i>29</i>
<i>G. Establecimiento de la estación experimental, para las pruebas de selección</i>	<i>30</i>

	<i>Página</i>
H. <i>Diagnóstico del Virus del mosaico del cardamomo en plántulas de viveros comerciales y plantaciones adultas de cardamomo</i>	31
IV. <i>RESULTADOS</i>	34
A. <i>Evaluación de la selección del material de cardamomo en plantaciones con alta incidencia al Virus del mosaico del cardamomo</i>	34
B. <i>Evaluación del material de cardamomo seleccionado del campo, e inoculado naturalmente en la estación experimental</i>	38
C. <i>Mecanismos de diagnosis en viveros comerciales y plantaciones adultas de cardamomo</i>	51
V. <i>DISCUSION</i>	58
VI. <i>CONCLUSIONES</i>	61
VII. <i>BIBLIOGRAFIA</i>	62

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro</i>		<i>Página</i>
1	<i>Codificación y origen del material promisorio libre del virus</i>	<i>35,36,37</i>
2	<i>Placas de ELISA-directo e indirecto con datos de líneas, valor promedio, desviación standard y coeficiente de variación</i>	<i>42</i>
3	<i>Número de muestras a recolectar por hectárea, a un nivel de confianza y error muestral máximo dados</i>	<i>53</i>
4	<i>Número de muestras a recolectar de acuerdo al número de plantas en vivero, a un nivel de confianza y error muestral máximo dados</i>	<i>54</i>
5	<i>Análisis de varianza respecto de las muestras de viveros comerciales</i>	<i>56</i>
6	<i>Valores promedio de las absorbancias de muestras compuestas por 20 submuestras cada una</i>	<i>57</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
1	<i>Principio de la técnica ELISA-directo</i>	20
2	<i>Diagrama de distribución de muestras y controles en las placas de ELISA</i>	22
3	<i>Principio de la técnica ELISA-indirecto</i>	25
4,5,6	<i>Representación de los porcentajes de infección por línea en síntomas y ELISA-directo</i>	39,40,41
7	<i>Controles positivos de cada placa y sus respectivos umbrales de infección</i>	43
8	<i>Representación del rango entre la mayor y menor lectura de cada línea por ELISA-directo</i>	45
9	<i>Representación del rango entre la mayor y menor lectura de cada línea por ELISA-directo</i>	46
10	<i>Regresión lineal y correlación entre - porcentajes de plantas infectadas con síntomas y ELISA-directo (sin corrección)</i>	47
11	<i>Regresión y correlación entre porcentajes de plantas infectadas con síntomas y ELISA-directo (con corrección)</i>	48
12	<i>Representación de los tres valores más altos de las plantas con resultados negativos en ELISA-directo</i>	49
13	<i>Representación de los tres valores más altos con resultado negativo en ELISA-indirecto</i>	50
14	<i>Regresión lineal y correlación en absorbancia por ELISA-directo e indirecto</i>	52

I. INTRODUCCION

El cardamomo (Elettaria cardamomum Maton) es uno de los cultivos, aunque relativamente reciente, de los más importantes en Guatemala. Su importancia como producto de exportación cobró significancia hasta mediados del siglo XX; su cultivo se inició en el país al principio de 1920. Esto debido principalmente a que la participación en el mercado externo ha ido en aumento constante, sobre todo desde los años sesenta. Ha llegado a convertirse al final de la década de los setenta, en el tercer producto de exportación del país. Guatemala ocupa el primer lugar como exportador de esta especie, a nivel mundial (24).

Este cultivo fue introducido a Guatemala alrededor de 1920, en el departamento de Alta Verapaz. Por la disponibilidad de condiciones de clima y suelo adecuados se propagó rápidamente a otras regiones. Fue llevado a la Costa Sur en 1940 (16). El área cultivada en 1979 se estima en unas 16 mil hectáreas con una producción de 32 miles de toneladas métricas de cardamomo en pergamino (24).

Guatemala es uno de los pocos países que cuenta con las condiciones ecológicas que el cultivo requiere. Por lo tanto, ha incrementado sus plantaciones en respuesta a la rentabilidad del cultivo en los últimos años. Además, el cardamomo no está sujeto a convenios internacionales que regulan las exportaciones y los precios de las mismas, de tal manera que posee más ventajas, comparado con los cultivos tradicionales como el café y la caña de azúcar.

Desde el punto de vista económico-social el cultivo es fuente de ingresos para un gran número de familias del área rural. Y por el tipo de cosecha que necesita no es una fuente temporal de ingresos, sino más bien permanente. En lo que se refiere al país, es una fuente de divisas de gran significado y de vital importancia, sobre todo en años de recesión económica como el que se está viviendo en 1983.

La mayor parte del área cultivada es poco o nada tecnificada. Con rendimientos menores de doscientos kilogramos por hectárea, mientras que las plantaciones con alto grado de tecnificación pueden alcanzar producciones que sobrepasen los 650 kilogramos por hectárea (24).

El cardamomo en la actualidad en Guatemala es víctima de una enfermedad conocida como "mosaico", la cual fue detectada por vez primera en la finca La Florida, Quetzaltenango, en el año de 1975 (18). A partir de ese año la enfermedad se ha diseminado a casi todas las plantaciones del país, quizás con excepción de la zona norte, aunque no hay datos concretos al respecto. Los daños producidos por el virus tampoco han sido evaluados en forma técnica-científica, pero se asume que la enfermedad afecta hasta un 70% de la producción actual y puede aún terminar de manera definitiva con este cultivo en el país, si no se encuentran las estrategias de control adecuadas.

En vista de lo grave del problema la Asociación de Productores de Cardamomo de Guatemala (APROCAR), hizo contacto con el Dr. Dennis Gonzales de la Universidad de Cornell, Estados Unidos de América, para que realizara un estudio del agente causante de la enfermedad, el vi-

rus del mosaico del cardamomo (VMCar).

En febrero de 1982, APROCAR gestionó que la Universidad del Valle de Guatemala se hiciera cargo de un programa de investigación conjunto, de tal forma que se firmó un convenio con el propósito de encontrar un medio de diagnóstico rápido, eficiente y relativamente económico. Además, de que se sentaran las bases para las medidas de control a corto y largo plazo con el fin de enfrentar el problema.

El objetivo del presente estudio es el de encontrar fuentes de resistencia al VMCar, por medio de la técnica serológica inmunosorbente enzima conjugada (ELISA), a partir de material encontrado aparentemente sano en áreas de alta incidencia de la enfermedad y establecer los mecanismos de diagnóstico.

La hipótesis planteada es que todas las variedades de cardamomo presentes en Guatemala son susceptibles al VMCar.

II. REVISION DE LITERATURA

A. El cultivo del cardamomo

El cardamomo es la semilla seca de una planta perenne, Elettaria cardamomum Maton, perteneciente a la familia Zingiberaceae. Se encuentra en forma silvestre en los bosques monzónicos, siempre verdes de los Ghats Occidentales en el Sur de India y Sri Lanka. Alrededor del año 1800 todo el abastecimiento provenia de estos bosques, y el cultivo consistia sólo en el aclareo parcial del bosque alrededor de las plantas silvestres (51).

1. Características botánicas

Las características de esta planta son divididas en la siguiente forma:

a. Estructura

El cardamomo es una planta perenne, herbácea con un rizoma subterráneo ramificado, del cual surgen varios brotes erectos con panículas también erectas o postradas. El rizoma es robusto, algo leñoso, en forma horizontal y con numerosas raíces fibrosas en la capa superficial. Los brotes, en número de 10 a 20 con 2.5 a 5 m de alto, están compuestos de hojas nacidas en forma de macollas. Las hojas son de dos láminas, lanceoladas y terminadas en punta, de 25 a 50 cm de largo y de 5 a 15 cm de ancho, de color verde oscuro y lisas en el haz y verde pálido en el envés. La superficie inferior puede ser tanto lisa como pubescente, dependiendo de la variedad y la raza (51).

La inflorescencia nace en la región radicular en la base de los

brotos con una longitud de 60 a 120 cm. Estas son panículas erectas, reclinadas o postradas y alargadas. Tiene brácteas medianamente largas de enrollamiento axilar, usualmente con dos o tres flores. Las flores son hermafroditas, zigomórficas y de cerca de 4 cm de largo y 1.7 cm de diámetro. La bracteola es tubular como el cáliz, el cual es verde, apenas tridentado y firme. El tubo de la corola es del mismo largo, más o menos que el del cáliz, con tres lóbulos angostos, frondosos y de color verde pálido. La parte más conspicua de las flores es el labelo compuesto de tres estambres modificados, de más o menos 1.8 cm de largo con punta ondulada; es blanco con líneas púrpura radiando desde el centro. Hay dos estaminoides rudimentarios separados y un estambre funcional. Este último tiene un pequeño filamento amplio, con una larga antera y una conexión con una pequeña cresta en el ápice. El ovario inferior consiste de tres carpelos unidos con numerosos óvulos en posición axilar y un estilo con un pequeño estigma capitado (51).

Los frutos son cápsulas triloculadas, redondas terminadas en punta, de color amarillo o verde claro, variando en tamaño de acuerdo a la variedad. Este contiene de 15 a 20 semillas de color pardo oscuro, rugosas, aromáticas, de más o menos 3 mm en largo y con una cubierta mucilaginoso. Ellas contienen un perispermo blanco y un pequeño embrión (51).

b. Citología

Según Darlington y Wylie el número cromosómico básico de *Elettia*

ria es $X = 12$, y de acuerdo con Gregory el número somático es de $2N = 48$ aunque Chakravorti lo menciona como $2N = 52$ (51).

c. Polinización

Las flores son auto-estériles, así que es necesario plantar una mezcla de clones para que la polinización sea efectiva. Ellas son visitadas por abejas y otros insectos, los cuales efectúan una polinización cruzada.

d. Sistemática

De acuerdo con Willys (51) el género Elettaria tiene siete especies en Indo-Malasia. El cardamomo silvestre y cultivado es Elettaria cardamomum Maton.

Alguna confusión existe respecto a la sistemática, razas, tipos y grados de E. cardamomum. Las variedades y razas son interfértiles, lo cual ha ayudado a una mayor confusión.

Dos variedades botánicas han sido reconocidas (51) en base al tamaño de la fruta:

d.1 Variedad major Thwaites

Este es el cardamomo silvestre de Sri Lanka, presente en los bosques húmedos de esta región, el cual es cultivado sólo ocasionalmente. Es una planta robusta aproximadamente de 3 m de alto, con pseudotallos rosados, hojas amplias y panículas erectas. El ovario y el cáliz son subtomentosos. El fruto, el cual es más largo que el de la variedad cardamomum, es alargado, de 2.5 a 5 cm en largo, levemente arqueado, - de color amarillo verdoso cuando maduro y pardo oscuro al secar, con

mayor número de semillas, aunque más largas y menos aromáticas.

d.2 Variedad cardamomum (sinónimos var. minor Watt; var. minúscula Burkill)

Esta variedad incluye la mayoría de las razas cultivadas. La estatura varía de 2.5 a 5 m de altura. La panícula es larga con flores más numerosas y puede ser postrada, arqueada o erecta. El ovario y cáliz son lisos. Los frutos más pequeños que los de la otra variedad con menos semillas, más pequeñas y más aromáticas.

Los frutos son amarillos cuando secan.

Muchas razas son reconocidas, de las cuales las más importantes son:

d.2.1 Cardamomo de Malabar

Las plantas raramente exceden los 2.7 m de altura, con ramas, cortas. Las hojas son de 30 a 45 cm de largo y son pubescentes en la superficie inferior; las panículas son de 60 a 90 cm de largo y postradas; los frutos son pequeños, globosos, redondeados u ovoides y levemente encorvados. Esta raza es muy susceptible al virus del mosaico.

d.2.2 Cardamomo de Mysoure

Las plantas son de crecimiento robusto, con tallos de hasta cinco metros de altura, con hojas gruesas, largas, las cuales son lisas en la superficie del envés. Las panículas son erectas o arqueadas y los frutos son largos, fusiformes, triangulados y lisos. Esta raza se considera que posee cierta resistencia al Virus del mosaico y se desarrolla adecuadamente para elevaciones mayores que el cardamomo de Malabar.

En Guatemala se acostumbra asignar diferentes nombres a las líneas que se producen, tales como: Cardamomo rojo, amarillo, blanco, grueso, largo, "pache", gran cardamomo, etc. Sin embargo, se cree que todas se derivan de las variedades cardamomum y majior Thwaites, de las cuales la primera es la más difundida por ser la más productiva y de mejor aceptación en el mercado internacional. Además, en las montañas de Alta Verapaz se ha reportado la existencia de plantas de cardamomo silvestre (24).

2. Ecología del cultivo

El cardamomo es un cultivo tropical que crece a altitudes entre los 760 y los 1400 m sobre el nivel del mar (51), pero con mejor resultado entre los 900 y los 1300 m (6), en áreas donde la precipitación pluvial por año sea mayor de 2000 mm bien distribuida durante ese lapso. El rango de temperatura adecuado es de 10 a 35 °C, con una media de más o menos 22 °C (51).

El cardamomo es muy susceptible a los vientos fuertes. La sombra es otro factor muy importante en el éxito del cultivo. Pues constituye un medio de protección tanto para los rayos directos del sol, como contra las fuertes corrientes de viento. Una sombra de 30 a 40% se considera adecuada (38). Sin embargo, en Guatemala bajo las condiciones de la Costa Sur se ha cultivado el cardamomo al sol, con resultados exitosos. Sobrepasando en producción por área al sistema tradicional bajo sombra.

Los suelos aconsejables son los de textura franco-arenosos con -

estructura estable. El terreno debe tener buena cobertura y adecuado abastecimiento de agua. El cardamomo requiere buen drenaje, este cultivo no tolera anegamientos (51).

3. Importancia económica

El uso principal del cardamomo en términos generales es con propósitos culinarios domésticos. El mercado internacional, no obstante, depende de la demanda creada por aplicaciones especializadas, las cuales envuelven a dos distintos mercados: Los países árabes del Medio Oriente y Escandinavia. En el pasado, ha sido tradicionalmente usado para aromatizar el café, y más recientemente, como saborizante de horneados como pasteles, panecillos, bollos y pan. En otros países de Europa y Norteamérica también es usado en la elaboración de algunas salsas, sopas, pescados enlatados y en la aromatización de algunos cigarrillos (41).

El aceite de cardamomo es producido en pequeñas cantidades en Guatemala, el cual es utilizado para dar sabor a ciertos licores, amargos, remedios y ocasionalmente en perfumería (46).

En Guatemala a partir de 1959 las exportaciones comenzaron a cobrar importancia. En 1978 se exportaron más de dos mil toneladas métricas, dando un ingreso que significó 30.8 millones de quetzales. De manera que se colocó en un tercer lugar entre los productos de exportación, después del café y el algodón (24).

El cardamomo requiere aproximadamente un total de 221 jornales por hectárea en un año, lo cual según las estimaciones de 1978, este -

cultivo dió ocupación a 14.7 miles de personas (24).

B. La enfermedad del mosaico del cardamomo

En Guatemala el VMCar fue detectado en 1975, en fincas del municipio de El Palmar, Quetzaltenango. Reconocimientos posteriores demostraron su presencia en toda la Costa Sur. No se ha hecho un estudio exhaustivo en cultivares de Alta Verapaz, empero en las pocas plantaciones observadas hasta la fecha no se ha encontrado (18).

La enfermedad se manifiesta primero en las hojas juvenes de las partes en crecimiento. La hoja pierde su uniformidad en el color verde y se desarrollan fajas o manchas cloróticas, las cuales son agudamente delimitadas. Las manchas crecen gradualmente en tamaño, frecuentemente corriendo juntas y ocupan una gran superficie de la hoja. En hojas con alto grado de infección las áreas son confinadas sólo entre las venas en franjas alargadas. En casos extremos la hoja es totalmente clorótica. De las hojas de la región apical la enfermedad se esparce gradualmente a las hojas bajas. Las plantas afectadas lucen cloróticas en comparación con las sanas que son de un verde obscuro. Cuando la planta es infectada desde una etapa muy joven, muestra un achaparramiento y no alcanza un desarrollo normal. Las plantas afectadas se marchitan gradualmente y se vuelven raquílicas. La cosecha decrece año con año. El deterioro de la plantación es tan rápido que en cuatro años del aparecimiento de la enfermedad las plantas quedan totalmente destruidas (41,17).

El agente causante de la enfermedad es un virus de varilla flexi-

ble (17). El cual ha sido reportado como no-persistente (47) y como semi-persistente (48) en el áfido Pentalonia nigronervosa que ha sido citado como el principal vector de la enfermedad en forma natural. La transmisión por medio de la semilla se cree que no es factible (1), - además intentos para probar la transmisión por la savia han dado resultados negativos (17).

C. Técnicas serológicas

La serología se basa en las reacciones inmunológicas. Estas tienen una base común. El agente inmunizador, llamado antígeno o inmunógeno que estimula al animal a que desarrolle proteínas llamadas anticuerpos en su suero sanguíneo; las cuales reaccionan específicamente con el antígeno que estimuló su producción. Afortunadamente para los virólogos los virus no tienen que infectar y multiplicarse en el animal para crear anticuerpos. Por lo que muchos virus en plantas son - eficientes inmunogenos. Más sin embargo, la reacción entre un anticuerpo y el antígeno puede ser fácilmente estudiada in vitro (19).

Los anticuerpos reaccionan específicamente con su antígeno homólogo porque se pueden unir de una sola forma. Las moléculas del anticuerpo tienen sitios activos en sus superficies y estos se cree que - son complementarios. Presumiblemente en forma molecular, carga e hidrofobicidad a los sitios antigénicos en la superficie de su antígeno homólogo. De tal suerte que en condiciones adecuadas ambos pueden combinarse (19).

Hay varias formas con las cuales se puede demostrar la reacción - entre partículas de virus y sus anticuerpos. La mayoría de métodos -

se realizan in vitro y muchos pueden ser usados cuantitativamente y -
cualitativamente para determinar las concentraciones de antígeno y an-
ticuerpo, pero estos difieren en conveniencia y sensibilidad. Algunos
de ellos son los siguientes: 1) Aglutinación de cloroplastos; 2) -
Prueba de tubo de precipitación; 3) Prueba de precipitación cuantita-
tiva; 4) Prueba de fijación-complemento; 5) Prueba de anillo inter-
fases; 6) Prueba de difusión en gel; 7) Prueba de inmuno-osmoforesis;
8) Técnica de anticuerpos traza (19).

D. La técnica inmunosorbente enzima conjugada (ELISA)

La técnica inmunosorbente enzima conjugada (Enzymelinked immuno-
sorbent assay) se adaptó en 1977 para la detección de virus en plan-
tas por Voller, et al (49) y Clark & Adams (7).

1. Fundamentos de la técnica ELISA

En este método el virus de la muestra probada es atrapado selec-
tivamente e inmovilizado por un anticuerpo específico y adsorbido a -
una superficie sólida. El virus atrapado reacciona con la ayuda de un
anticuerpo específico, al cual se le ha enlazado una enzima. Después
de lavar, la enzima que ha formado un complejo con el virus atrapado,
es detectado colorimétricamente por la adición de un substrato adecua-
do a la enzima (7), y el cual por hidrólisis da una coloración amari-
lla (2).

El conjugado anticuerpo-fosfatasa alcalina (enzima) tiene suma -
importancia. La reacción de condensación se lleva a cabo en los gru-
pos epsilon-amino de la lisina y los grupos alfa-amino terminales de -

las proteínas reactantes, a través de la formación de una base de Schiff; el glutaraldehído actúa como agente condensante (4).

2. Condiciones de la técnica ELISA

Muchas técnicas serológicas convencionales no pueden ser usadas a causa de limitaciones tales como bajas concentraciones del virus, costo de reactivos, equipo sofisticado y otras. Las cuales son ampliamente superadas por ELISA (7). Las ventajas particulares de la técnica ELISA sobre otras de anticuerpo-enlazado, son la combinación en la economía de reactivos, la extrema sensibilidad y su potencial de medición. También es altamente versátil detectando virus isométricos y filamentosos, tanto en preparaciones purificadas como en extractos crudos del hospedero (7).

La técnica enzima inmovilizada ha sido reportada como más sensible en comparación con las técnicas de radio-inmovilizadas (2).

La eficiencia de la técnica ELISA es independiente de la relación antígeno-anticuerpo. También se ha reportado recientemente que para varios virus la especificidad de ELISA es tal, que preparados para detectar otra, serológicamente muy relacionadas.

3. Tipos o clases de ELISA

La técnica de enzima inmovilizada ha tenido algunas modificaciones, las que han dado origen a distintos tipos, los cuales varían en algunas de sus características de detección serológica. Estos son:

a. Directo o de doble sandwich

El tipo más conocido y del cual existe información bien documentada

da es el método de doble sandwich (42,36,52). Este tipo consiste en la adhesión de la gama-globulina anti-virus específica a la placa de poliestireno por un buffer de carbonato de sodio a pH 9.6. A continuación se colocan las muestras del material a investigar, de manera que si el virus está presente pueda ser atrapado por los anticuerpos y fijados a éstos por una reacción antígeno-anticuerpo. Después se adiciona otra gama-globulina conjugada a una enzima, para completar el doble sandwich. Por último, se adiciona el substrato de tal suerte que si es virus está presente durante el proceso una reacción amarilla (7).

Este método tiene la desventaja de que necesita conjugar la enzima a cada antisuero purificado. Además la especificidad de esta prueba es tan alta que puede diferenciar líneas muy relacionadas serológicamente del mismo virus (12).

b. Indirecto

Este es un nuevo método y se ha empleado poco. En términos generales consiste en la adhesión de las muestras de material en estudio a la placa de poliestireno por un buffer de carbonato de sodio, si en la muestra existe virus, este se adhiere a la pared de los pocillos de las placas de poliestireno. Más tarde se coloca la gama-globulina anti-virus de conejo, preadsorbida, de manera que se enlace a las partículas del virus. A continuación se adiciona una gama-globulina anticonejo conjugada a una enzima, de suerte que se enlace a los antiviruses. Por último se adiciona el substrato, de forma que si se ha dado origen al complejo virus-antivirus-anticonejo se obtenga una reacción positi-

va (21).

Esta prueba tiene la ventaja de que no es necesario conjugar específicamente la enzima a cada antígeno a ser probado y elimina la extrema especificidad, permitiendo una evaluación de las relaciones entre las líneas (10).

4. Análisis de las muestras

La toma de decisión respecto a considerar una muestra infectada en algunos casos dudosos es difícil, ya que el punto a partir del cual debe considerarse la reacción como positiva, visualmente, es muy subjetiva. Por tanto, la evaluación de positividad hace necesario el uso del análisis fotométrico. Clark (7) obtuvo diferencias de la intensidad de color iguales a un cambio de 0.150 a 0.200 en absorbancia a 405 nanómetros de longitud de onda en extractos de planta sana. Muestras con lecturas arriba de 0.150 del control (extracto de planta sana) fueron consideradas como positivas. Otro método utilizado para la determinación del umbral de infección en las lecturas de muestras con el Virus del enrollamiento de la papa (PLRV) fue considerado a partir de la media aritmética de la absorbancia de los controles sanos más dos desviaciones standard (8). Y Diez (16) toma tres desviaciones standard en adición a la media aritmética de los controles sanos para la determinación del umbral de infección.

E. Resistencia de las plantas a enfermedades virales

La resistencia es un concepto relativamente nuevo en cuanto a su uso en el control de enfermedades, pero antiguo en relación a su

existencia. En plantas específicamente, se define como la habilidad de la planta a oponerse, disminuir o sobrepasar el ataque de un patógeno (50). Pero a diferencia de inmunidad, no es una cualidad absolutamente invariable y puede ser sobrepasada por exposición a inóculo masivo bajo condiciones altamente favorables al patógeno (11). La inmunidad significa que no se está sujeto al ataque del patógeno, es decir que existe una resistencia total (50). Algunos dividen la resistencia en vertical, que se expresa únicamente contra algunos biotipos de una especie de organismo, y horizontal aquella que se expresa en contra de varios de los biotipos (28). También se hace mención de otra clase de resistencia debida a la muerte prematura del tejido infectado, lo que resulta en la inactivación del agente atacante (11).

La verdadera resistencia es diferente de aquellas circunstancias que dependen de alguna característica estructural o fisiológica de la planta que prevee la invasión efectiva del patógeno. Esto genera una actividad protoplásmica debida a una reacción específica. Sin embargo, causas de inmunidad o resistencia debidas a características anatómicas de la planta prevee la entrada del patógeno a la misma. Si se consideran las causas de verdadera inmunidad o resistencia, se induce una masa de evidencias anatómicas, fisiológicas, bioquímicas y ecológicas. Algunas teorías para explicar casos específicos y otras para explicar el problema en general (50).

Los grados de resistencia mostrados por las plantas no deben ser tomados como fijos y absolutos. La temperatura, humedad, fertilidad y reacción del suelo afectan marcadamente el desarrollo de la enfermedad.

Otros factores como la edad y madurez de la planta pueden afectar la resistencia (50). En algunas enfermedades virales ha sido reportado recientemente que los efectos predominantes de la adición de nutrimentos es para incrementar la susceptibilidad (11). Se ha dicho también que la mayoría de plantas son más susceptibles a la infección viral - cuando están jóvenes, y su resistencia natural aumenta con la edad - (11).

El concepto de resistencia necesita ser definido, no sólo en conceptos de la relación patógeno-hospedero sino en términos que incluyan las condiciones ambientales y la influencia de éstas tanto en el parásito como en el hospedero. Estos últimos organismos vivientes que poseen capacidades inherentes de variación (11).

Cuando el hospedero y parásito han tenido una larga asociación, entonces en el proceso evolucionario formas resistentes han sido desarrolladas por selección natural. Ya que, sin tales factores de resistencia no podrían haber sido sobrevivientes (11). Es más, aún cuando se logra un riguroso aislamiento de un virus clonal, usualmente éste contiene una pequeña pero finita proporción de variantes (19).

Para la realización de experimentos y pruebas de resistencia deben escogerse sitios donde la incidencia de la enfermedad sea extremadamente alta, la exposición severa y uniforme, además de otras condiciones conducentes a una investigación eficiente (11).

El éxito del fitomejoramiento radica en una amplia aplicabilidad, o la utilización del más extenso arreglo de los genotipos, tanto del -

patógeno como del hospedero (11). Puesto que la mayoría de las resistencias está sujeta a la pérdida debida a la aparición de otras cepas virales. Esto ha sucedido por ejemplo, con aquellas fuentes de resistencia encontradas en el Virus de la papa (PVY) y del Virus del mosaico del pepino (CMV), las cuales fueron perdidas después de ser introducidas en diferentes cultivos de Chile (9,10).

III. MATERIALES Y METODOS

A. Reactivos

La aplicación de la técnica ELISA, necesita de los siguientes reactivos:

1. Suero de conejo anti-virus específico al Virus del mosaico en cardamomo.

Este antisuero fue producido por el Dr. Dennis Gonsalves, a partir de partículas del VMCar, purificadas por él en la Universidad de Cornell. El virus fue inyectado en forma periódica en conejos, los que fueron sangrados a ciertos intervalos, dando como resultado diferentes antisueros.

2. Suero de cabra anti-conejo específico a la gama-globulina de conejo. Este se consigue comercialmente con la siguiente denominación Sigma No. A-8025.

3. Suspensión de secciones de hojas de cardamomo

Fracciones de la hoja son maceradas y extraídas en el buffer de acuerdo al tipo de técnica ELISA a utilizar. Dependiendo de la técnica también se realiza la dilución de muestra en relación al buffer.

Los otros reactivos usados son los descritos por Clark & Adams (7) y por Gonsalves (21).

B. Procedimiento de la técnica de ELISA

Para facilitar la descripción de cada uno de los tipos de técnica se detallan a continuación:

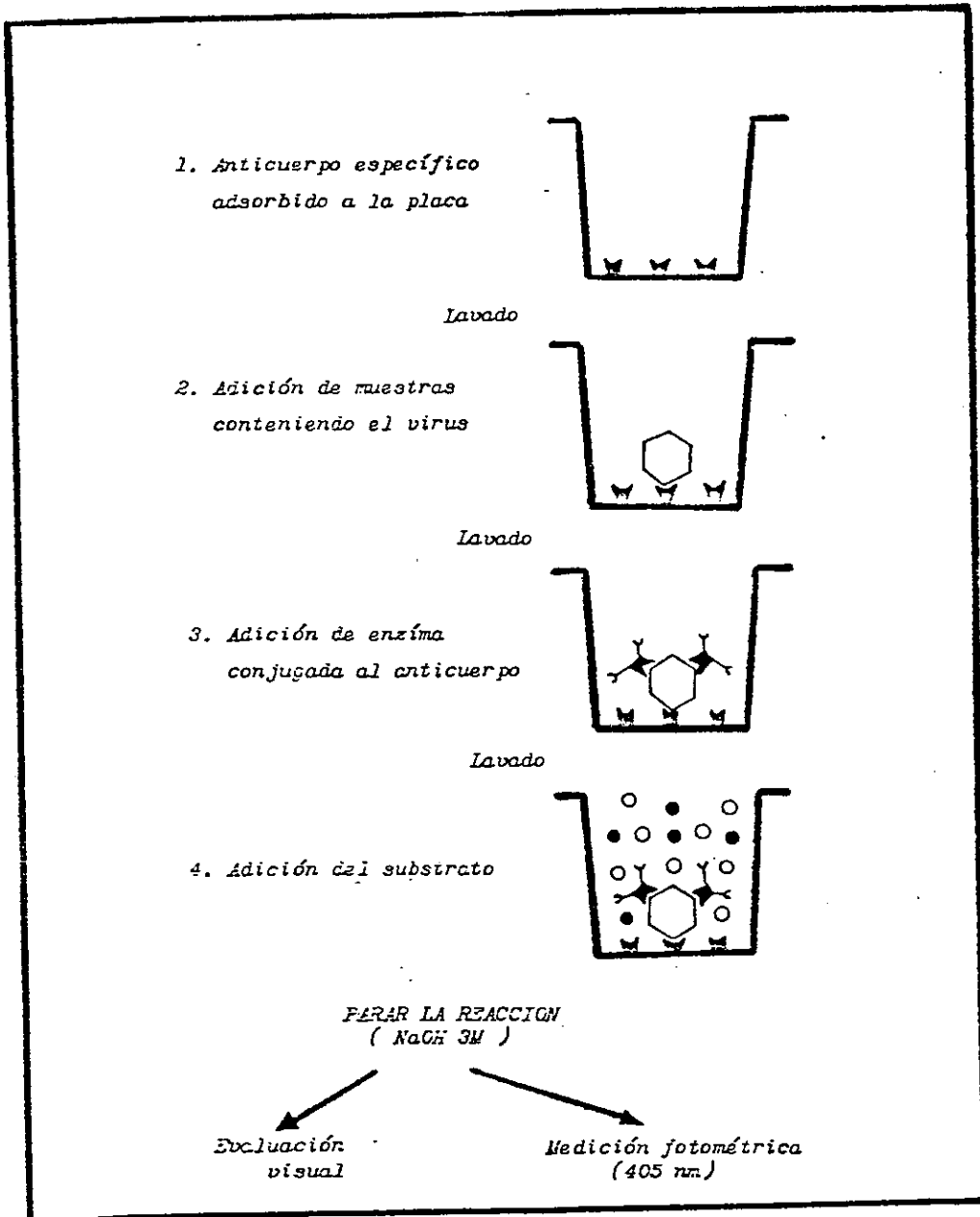


Fig. 1

Principio de la Técnica de ELISA-directo.

1. Técnica de ELISA-directa

El procedimiento utilizado en el presente trabajo es el descrito por Clark & Adams (7).

a. Primer paso

Se utiliza una placa de poliestireno de noventa y seis pocillos - donde se adhieren los anticuerpos en cada uno de ellos. Para esto se hace una dilución de la gama-globulina hasta llevarla a una concentración de cinco microgramos por mililitro en una solución buffer de carbonato de sodio a pH 9.6. Las placas se llenan con 0.20 ml por pocillo y luego selladas con Parafilm, para evitar alguna contaminación. Luego las placas se incuban en cajas de humedad a 37 °C por un período de 2 a 2.5 horas. Al cumplirse ese tiempo se lavan tres veces las placas con buffer salino de fosfatos-Tween (PBS-Tween), dejando cada una por un lapso de tres minutos antes de enjuagar. Esto con el propósito de eliminar todos aquellos anticuerpos que no hallan sido adheridos a las paredes de los pocillos, ver fig. 1.

b. Segundo paso

Utilizando el extracto crudo de las plantas a probar, fig. 1, se procede a llenar tres pocillos con cada muestra, las que pueden ser de 25 a 28 por placa. Los espacios restantes se distribuyen en la placa a manera de que los controles utilizados queden estratégicamente colocados. Los controles usados, fig. 2, son tres: Un extracto de planta sana ($K\bar{c}$), uno de planta enferma (Kc^+) y el último con buffer de extracción (B). Cada pocillo es llenado con 0.20 ml de la suspensión.

Kc^- = control negativo Kc^+ = control positivo B = control buffer
M = muestra a probar

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kc^-	B	Kc		M 1			M 2		Kc^-	B	Kc^-
B		M 3			M 4			M 5			M 6	
C		M 7			M 8			M 9			M 10	
D		M 11			M 12			M 13			M 14	
E		M 15			M 16			M 17			M 18	
F		M 19			M 20			M 21			M 22	
G		M 23			M 24			M 25			M 26	
H	Kc^+	B	Kc		M 27			M 28		Kc^-	B	Kc^+

Fig. 2 Diagrama de distribución de muestras y controles en las placas de ELISA.

Después de llenados los pocillos se sella la placa con Parafilm y se incuba en una caja de humedad en un refrigerador a 6 °C durante 8 a 12 horas. Transcurrido ese tiempo se procede a lavar cuatro veces - con PBS-Tween, la primera enjuagando inmediatamente la placa y las restantes dejando un intervalo de tres minutos de igual forma que en el primer paso. Todo esto con el propósito de eliminar todos aquellos residuos que no esten adheridos a las paredes de los pocillos, específicamente a los anticuerpos.

c. Tercer paso

Cada pocillo vuelve a llenarse con gama-globulina enlazada con - fosfatasa alcalina, fig.1, empleando la concentración más adecuada, - cercana a 1:400. A continuación se incuba la placa sellada, dentro de una caja de humedad a una temperatura de 37 °C por 2 a 2.5 horas. Durante este tiempo, si el virus está presente se completa la reacción - denominada de "doble sandwich", es decir, el complejo anticuerpo-virus anticuerpo conjugado. Transcurrido el tiempo se lava la placa con PBS-Tween, tres veces dejando un intervalo entre lavadas de tres minutos - antes de enjuagar, fig.1.

d. Cuarto paso

Se utiliza como substrato p-nitrofenil fosfato diluido en un buffer de dietanolamina ajustado a pH 9.8, a razón de 1 mg/ml. Se colocan 0.25 ml de la dilución por pocillo, asegurándose de que este recién preparada, fig.1. La placa se deja reposar a temperatura ambiente, - hasta que se pueda visualizar en forma clara la reacción en aquellos -

pocillos donde se llevo a cabo el "doble sandwich" durante el proceso. En el momento que se considera que la respuesta es lo suficientemente apreciable se procede a detener la reacción por medio de una solución de Hidróxido de Sodio ($\text{NaOH } 3M$).

Inmediatamente después de detener la reacción se hace la lectura de la intensidad de color, al medir la absorbancia a 405 nanómetros. El umbral de infección se calcula sumándole a la media aritmética de los controles negativos tres desviaciones standard.

2. Técnica de ELISA-indirecta

El procedimiento utilizado en el presente trabajo es el descrito en las notas de laboratorio del Dr. Dennis Gonsalves.

a. Primer paso

Usando una placa de poliestireno de noventa y seis pocillos se adhieren a ellos las muestras, para ello estas son extraídas en una solución buffer de carbonato de sodio de pH 9.6 en una relación de dilución de 1:50. Se adicionan 0.20 ml por pocillo de las muestras a evaluar, fig.3. Las placas son selladas con Parafilm y puestas en cajas de humedad, las que son incubadas por 2 a 2.5 horas a una temperatura de 37°C ó bien toda la noche en una refrigeradora a 6°C . Cumplido el tiempo, se lavan las placas con PBS-Tween, tres veces, dejando un intervalo de tres minutos entre lavado, antes de enjuagar.

b. Segundo paso

Con anticuerpos específicos de VMCar se procede a preadsorber la gama-globulina a otras proteínas de la planta. Este proceso consiste

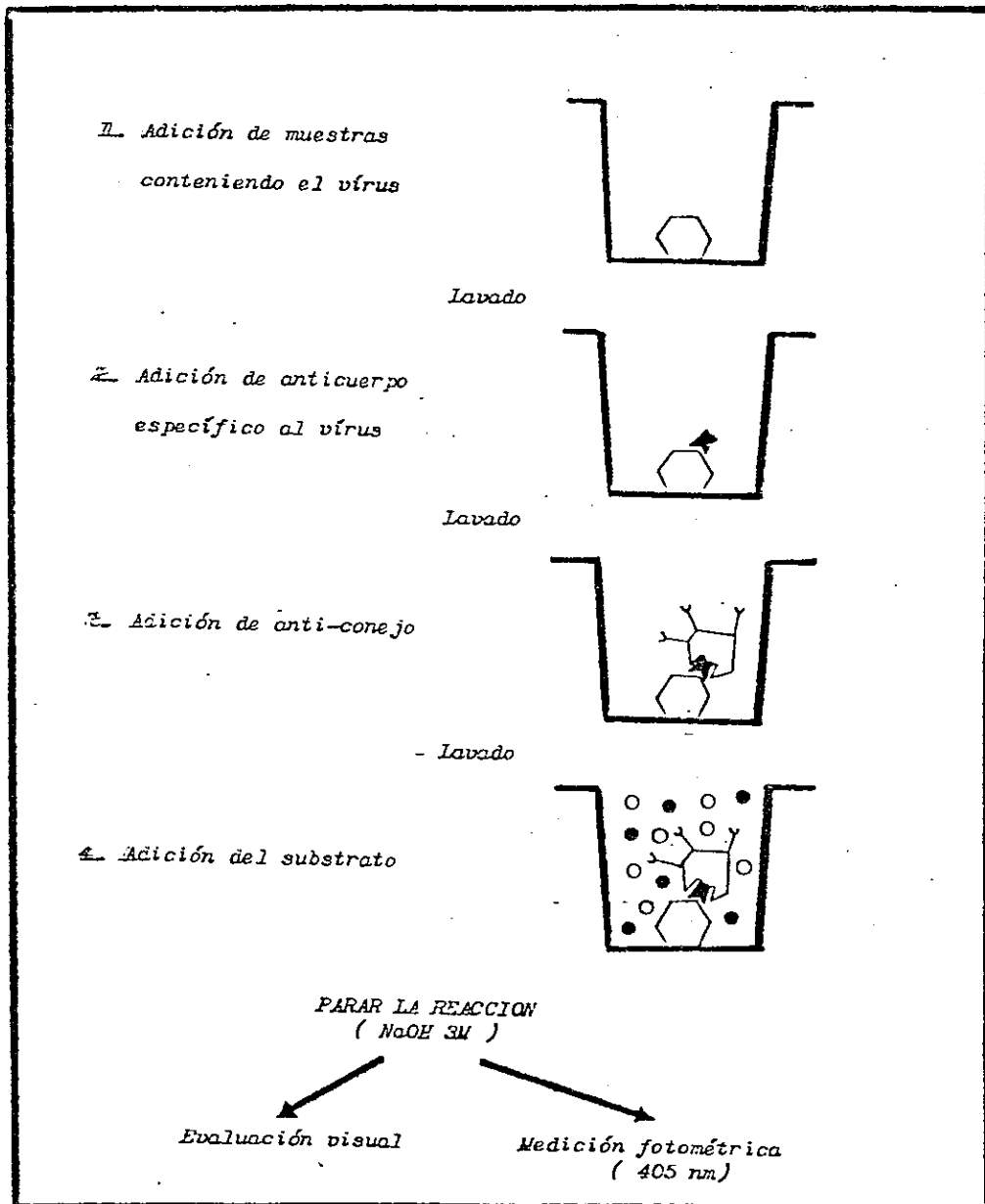


FIG. 3
Principio de la Técnica ELISA-indirecto.

en lo siguiente: Se macera un tejido sano a una dilución de 1:20 en buffer de enzima. Se filtra a través de una gaza. Se mide el extracto sano de manera que sea un décimo del volumen total de la gama-globulina y el buffer usado en este paso. Se adiciona la gama-globulina diluida 1:500 del volumen total. Se deja reposar de 3 a 5 minutos. Se agita suavemente para mezclarla lo mejor posible. A esta mezcla se le agrega el buffer de enzima necesario para llegar al volumen total.

Se llenan los pocillos con alícuotas de 0.20 ml de la solución de gama-globulina preadsorbida, fig.3. Se incuba 2 a 2.5 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo se lava tres veces, a intervalos de tres minutos con PBS-Tween.

c. Tercer paso

Se prepara el anti-conejo de cabra, conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Se diluye 1:1000 en buffer de enzima. Se llenan los pocillos con alícuotas de 0.20 ml, fig.3. Luego se incuba por 2 a 2.5 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo se lava la placa con PBS-Tween, tres veces a intervalo de tres minutos.

d. Cuarto paso

Se adicionan 0.25 ml del substrato, p-nitrofenil fosfato, diluido en buffer de dietanolamina ajustado a pH 9.8, a razón de 1 mg/ml. Se mantiene a temperatura ambiente el tiempo necesario hasta observar claramente la reacción. En ese momento se detiene la reacción al agregar 0.50 ml de Hidróxido de sodio 3M a cada pocillo. Luego se eva

lúa la reacción de la misma forma que se hizo con ELISA-directo, ver fig.3.

C. Purificación de la gama-globulina

Para la purificación de la gama-globulina del antisuero de conejo se pueden seguir varios procedimientos. En el presente trabajo se usó el descrito por Clark & Adams (7).

A un mililitro de gama-globulina se le adicionan 9 ml de agua - destilada. Lentamente se le agregan 10 ml de una solución saturada - de sulfato de amonio, aproximadamente, a la media hora. Se incuba de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Al transcurrir este tiempo - se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos y se colecta el precipitado. Se disuelve este en dos mililitros de 0.5 PBS. A continuación se dializa a temperatura de 4 °C tres veces, con un lapso de tiempo - de tres a cuatro horas cada una en 0.5 PBS.

El fraccionamiento de la gama-globulina con DEAE se hace por medio de una columna de intercambio iónico. Para empezar se agita el - DEAE disuelto en etanol al 28% y se mide de 5 a 10 ml. Luego se coloca en un beacker de vidrio. Se lava el DEAE con agua destilada, agitando suavemente en espiral. Se deja reposar hasta que estabilice. - Se remueve el líquido sobrenadante con una pipeta de Pasteur y se elimina. Se repite el procedimiento 10 veces con agua y tres con 0.5 PBS. Al terminar el lavado se humedece la columna con 0.5 PBS, asegurándose de que la membrana quede cubierta. Es recomendable llenar antes el capilar con agua destilada para evitar burbujas. Se coloca el DEAE -

al mismo tiempo en la columna. Usando una pipeta de Pasteur se lavan hacia abajo todos los lados de la columna con 0.5 PBS, pero llenando hasta donde el DEAE está completamente equilibrado. Se miden el pH y la conductibilidad del 0.5 PBS antes de lavar. Se extrae el 0.5 PBS bajando en la columna hasta el menisco del DEAE. Se echa la gama-globulina con una pipeta de Pasteur, muy cuidadosamente, sin disturbar el DEAE. Se extraen dos mililitros, uno por tubo. Cuidadosamente se llena la columna con PBS; ésta se mantiene llena todo el tiempo. Para finalizar se extraen 13 ml (uno por tubo). Y se mide la concentración en OD (dioptrías ópticas) a 280 nanómetros de todos los tubos, incluyendo dos de desecho.

D. Conjugación de la enzima con la gama-globulina

Para este proceso se centrifugan 5000 unidades de fosfatasa alcalina y se colocan en un tubo de precipitado. Y se desecha el líquido sobrenadante. El precipitado se disuelve en dos miligramos de gama-globulina purificada. Se dializa tres veces en contra de PBS. Se le adiciona glutaraldehído en solución acuosa, mezclándolo bien, hasta lllevarlo a una concentración final de 0.06%. Este preparado se deja en reposo por cuatro horas a temperatura ambiente, en donde se desarrolla un color pardo-amarillento. El material se vuelve a dializar tres veces en PBS para remover el glutaraldehído. Finalmente se le adiciona albúmina de huevo para llevarla a una concentración de 5 mg/ml y se guarda en refrigeración a 4 °C por tiempo indefinido en tubos previamente siliconados.

E. Preparación de las muestras a analizar con ELISA

La preparación de la muestra a estudiar es diferente, dependiendo del tipo de ELISA utilizado. De manera que a continuación se detalla el procedimiento para cada una:

1. ELISA-directo

La suspensión es obtenida por medio de la maceración de secciones de hoja utilizando un buffer de extracción de pH 7.4. La maceración se hace por medio de un aparato llamado "tissumizer". La relación de dilución que se utilizó de hoja respecto del buffer fue la de 1:25. - Para evitar la contaminación en el aparato se hacen dos lavados con agua destilada a alta velocidad y se quitan los residuos con un par de pinzas. También es importante pasar antes las muestras que se suponen sanas y después las que presentan síntomas visuales de la enfermedad.

2. ELISA-indirecto

La suspensión en este caso es obtenida por medio de la maceración de las secciones de hoja, pero en este método se utiliza un buffer de carbonato de sodio de pH 9.6. El resto del procedimiento es el mismo de ELISA-directo excepto que la relación de dilución de la sección de hoja respecto del buffer es de 1:50.

F. Selección del material de cardamomo en plantaciones con alta incidencia al VMCar.

Se visitaron varias de las plantaciones de cardamomo de la Costa Sur y se buscaron aquellas plantas que estando bajo un alto grado de

incidencia de la enfermedad se presentaran como aparentemente sanas. De esas plantas se tomó una muestra, se marcó el lugar y se tomaron los datos necesarios. Las muestras fueron evaluadas por medio de la prueba de ELISA-directo en el laboratorio.

Todas aquellas plantas aparentemente sanas que dieron un resultado negativo a la prueba de ELISA fueron recolectadas y llevadas a la estación experimental, localizada en la finca Altamira.

G. Establecimiento de la estación experimental para las pruebas de selección

La estación experimental se estableció en un área donde la incidencia de la enfermedad es alta, la infección severa y puede decirse que uniforme debido a que es un área cardamomera sujeta al ataque viral fuerte.

La estación está ubicada según Holdrich en un bosque subtropical húmedo, en la finca "Altamira", municipio de San Francisco Zapotitlán, Departamento de Suchitepéquez.

1. Formación de la estación e introducción del material de cardamomo con posible resistencia al VMCar

La estación de prueba de susceptibilidad es una pequeña área rodeada de cardamomo infectado con VMCar y bajo sombra de café. La parcela consta de dos hileras de bloques en forma transversal, cada uno conteniendo once posturas provenientes de una de las plantas seleccionadas a nivel de campo. Las plantas individuales, fueron recolectadas y divididas de tal forma que se obtuvieran las posturas necesarias -

con que cuenta cada bloque.

2. Inoculación natural con VMCar y observación del material de cardamomo

La inoculación del material se produjo únicamente en forma natural. Se ha considerado que la diseminación de las partículas de VMCar es causado por vectores provenientes de las plantaciones vecinas al área de prueba.

Todas las plantas de la estación fueron evaluadas respecto a la presencia de síntomas visuales, característicos de la enfermedad al momento de tomar las muestras para laboratorio.

3. Selección y evaluación del material post-inoculación natural

Todo el material recolectado en la estación fue evaluado en tres diferentes formas: a) Síntomas visuales; b) Por el método serológico de ELISA-directo en todas las plantas individualmente; y c) Por el método de ELISA-indirecto en las tres plantas (posturas) que presentaron los valores más altos en absorbancia respecto de la línea total.

La selección se hizo en base al porcentaje de infección que presentó cada línea completa. Además, se realizó una evaluación de susceptibilidad de las líneas que presentaron mayor concentración de virus en la muestra trabajada en laboratorio.

H. Diagnóstico del VMCar en plántulas de viveros comerciales y

Plantaciones adultas de cardamomo

1. Cálculo del tamaño de las muestras

Para evaluar plantaciones adultas o viveros comerciales de cardamomo se necesitó establecer un mecanismo que permita hacer un mues-

treo con un nivel de confianza conocido, una estimación del error muestral. Y que al mismo tiempo fuera fácil de manejar aún cuando el número de muestras sea grande, de manera que fueran evaluadas sin dificultad.

El material sujeto a estudio de resistencia fue tomado como una población bajo un grado incipiente de infección con VMCar y servir como base en el establecimiento de los tamaños de las muestras a tomar para la detección de infecciones con VMCar en otros cultivares o viveros de cardamomo. Puesto que la población estudiada fue de 449 plantas individuales, su comportamiento es de acuerdo a una distribución "Z", por lo que se puede determinar el número de la muestra a partir de la desviación standard de la misma, por medio de la relación siguiente:

$$n = \frac{z^2 T^2}{E^2}$$

La desviación standard se calculó a partir de la lectura de absorción de cada muestra y en cada placa en forma individual. La media aritmética de las desviaciones standard de todas las placas se tomó como la desviación standard de toda la población.

2. Número de muestras a evaluar por placa

Debido a que el número de muestras a evaluar por placas es limitado, se buscó una alternativa que permita incrementar el número de -

muestras, sin afectar la confiabilidad del resultado. En base a que la técnica ELISA-indirecto es más sensible se eligió ésta para probar si al agruparse varias muestras en una sola, puede detectarse la infección a través de este método.

Para esto se utilizó una placa de poliestireno (Elisa), usando cada dos hileras horizontales como un sólo bloque. Se usó el diseño experimental de bloques completos al azar con el propósito de medir la diferencia entre las lecturas de absorbancia a 405 nm de las pruebas hechas entre plantas sanas y plantas enfermas.

Se usaron diez distintas muestras, compuestas de 20 submuestras, lo que globaliza un total de 200 submuestras, lo cual hizo al muestreo más significativo estadísticamente. Las muestras fueron extraídas al azar del vivero, a fin de tener una probabilidad adecuada de encontrar alguna planta con infección viral. Además de las plantas muestreadas se usaron en la placa extractos de planta sana y enferma como controles negativo y positivo respectivamente.

El método utilizado fue el de ELISA-indirecto y a partir de los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia, se calculó el análisis de varianza y se hizo una diferenciación de medias usando el comparador de Tukey (D.H.S.).

La placa tiene ocho hileras verticales, lo que permite cuantificar cuatro repeticiones (4 bloques). La distribución de las muestras en cada bloque, independiente de los otros, se realizó por medio de una tabla de números aleatorios.

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente orden:

- A. Evaluación de la selección del material de cardamomo en plantaciones con alta incidencia al virus del mosaico del cardamomo;
- B. Evaluación del material de cardamomo seleccionado del campo e inoculado naturalmente en la estación experimental;
- C. Mecanismos de diagnosis del VMCar en plantaciones adultas y viveros comerciales.

A. Evaluación de la selección del material de cardamomo en plantaciones con alta incidencia al Virus del mosaico del cardamomo

Todo el material que fue encontrado aparentemente sano, fue sometido a la prueba de ELISA en el laboratorio y reevaluado como positivo o negativo, según la reacción a la prueba. Del material con apariencia sana, solamente un 26.21% fue evaluado como positivo, es decir que se detectó la presencia del virus en él. La evaluación en esta etapa se limitó simplemente a una evaluación visual de la reacción.

Las plantas que fueron reevaluadas sin VMCar a partir de material de apariencia sana en plantaciones de alta incidencia fueron recolectadas y sembradas en la estación experimental en bloques de once posturas a partir de la división y reproducción por rizoma. El material presente en la estación y su origen se presenta en el Cuadro 1.

De 54 líneas obtenidas de las áreas infectadas con VMCar y sembradas, se obtuvo un porcentaje de desarrollo de 75.59%, lo que equivale

Cuadro 1 Codificación y origen del material promisorio libre del virus, plantado en la Estación Experimental ubicada en la Finca Altamira.

Código en la Estación Experimental	Material recolectado en	
	Nombre de la Finca	Sección de la Finca
1-A	Fca. Dolores	La Esperanza
1-B	Fca. Dolores	La Victoria
2-A	Fca. Las Margaritas	La Unión
2-B	Fca. Las Margaritas.	La Isla
3-A	Fca. Medellín	Guarumales Altos
3-B	Fca. Medellín	Guarumales Altos
4-A	Fca. Medellín	Guarumales Altos
4-B	Fca. Medellín	Guarumales Altos
5-A	Fca. Medellín	Guarumales Altos
5-B	Fca. Las Margaritas	La Unión
6-A	Fca. Las Margaritas	La Unión
6-B	Fca. Las Margaritas	La Unión
7-A	Fca. Patzulín	Ixcanalera I
7-B	Fca. Patzulín	Ixcanalera I
8-A	Fca. El Porvenir	Ranchería
8-B	Fca. El Porvenir	Ranchería
9-A	Fca. El Porvenir	Ranchería
9-B	Fca. El Porvenir	Ranchería
10-A	Fca. Altamira	Transval

Continuación Cuadro 1.

Código en la Estación Experimental	Material recolectado en	
	Nombre de la finca	Sección de la Finca
10-B	Fca. Altamira	Transval
11-A	Fca. Altamira	Transval
11-B	Fca. Altamira	Transval
A-12	Fca. Altamira	Transval
B-12	Fca. Altamira	Transval
A-13	Fca. Altamira	Transval
B-13	Fca. Dolores	Miramar
A-14	Fca. El Encanto	Concepción
B-14	Fca. El Encanto	Concepción
A-15	Fca. El Encanto	Concepción
B-15	Fca. El Encanto	Concepción
A-16	Fca. Culpán	_____
B-16	Fca. Culpán	_____
A-17	Fca. Culpán	_____
B-17	Fca. Culpán	_____
A-18	Fca. Culpán	_____
B-18	Fca. Culpán	_____
A-19	Fca. Culpán	_____
B-19	Fca. Culpán	_____

Continuación Cuadro 1.

Código en la Estación Experimental	Material recolectado en	
	Nombre de la finca	Sección de la finca
A-20	Fca. Culpán	_____
B-20	Fca. Culpán	_____
A-21	Fca. Culpán	_____
B-21	Fca. Culpán	_____
A-22	Fca. Culpán	_____
B-22	Fca. Culpán	_____
A-23	Fca. Culpán	_____
B-23	Fca. La Igualdad	Igualdad
A-24	Fca. La Igualdad	Igualdad
B-24	Fca. La Igualdad	Igualdad
A-25	Fca. La Igualdad	Igualdad
B-25	Fca. La Igualdad	Igualdad
A-26	Fca. La Igualdad	Igualdad
B-26	Fca. La Igualdad	Igualdad
A-27	Fca. La Igualdad	Igualdad

a un promedio de ocho posturas por línea. Siendo la línea 20B la única pérdida, pues no desarrolló ninguna postura.

B. Evaluación del material de cardamomo seleccionado del campo e inoculado naturalmente en la estación experimental

El material recolectado en la estación fue evaluado aproximadamente a los ocho meses después de su siembra. La evaluación se realizó a nivel de postura individual, es decir toda la población. Toda muestra recolectada implicó la evaluación de síntomas visuales al momento de la toma. Estos resultados fueron comparados con la evaluación de los métodos de diagnóstico ELISA-directo e indirecto como puede verse en las figuras 4, 5 y 6.

1. Por el método ELISA-directo se evaluaron las 54 líneas con las posturas presentes en cada una de ellas. La placa en la que fueron corridas puede verse en el Cuadro 2 el que incluye las correspondientes desviaciones standard y coeficientes de variación.

De las 54 líneas evaluadas, 24 presentaron un porcentaje nulo de infección, tanto en análisis fotométrico como visual. El umbral de infección varió respecto de la placa y esta diferencia fue debida al tiempo de parar la reacción. Pero el umbral fue estandarizado mediante el cálculo del mismo a partir del valor de la media aritmética del control negativo más tres desviaciones standard. En general estas desviaciones tuvieron un rango de variabilidad de 0.021 hasta 0.195, Cuadro 2.

En la figura 7 puede notarse el punto a partir del cual las mues-

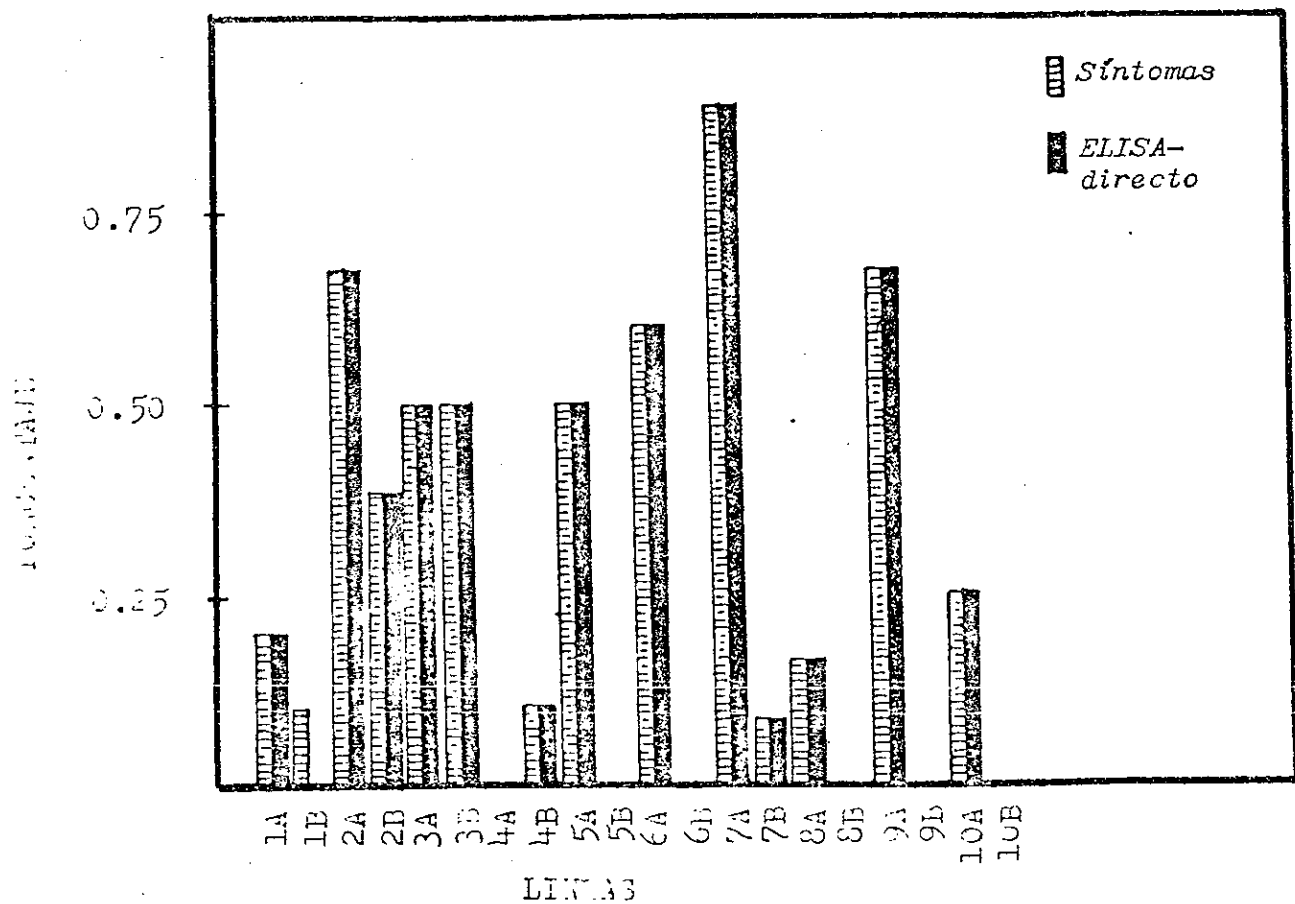


Fig. 4 Representación de los porcentajes de infección por línea en síntomas y ELISA-directo.

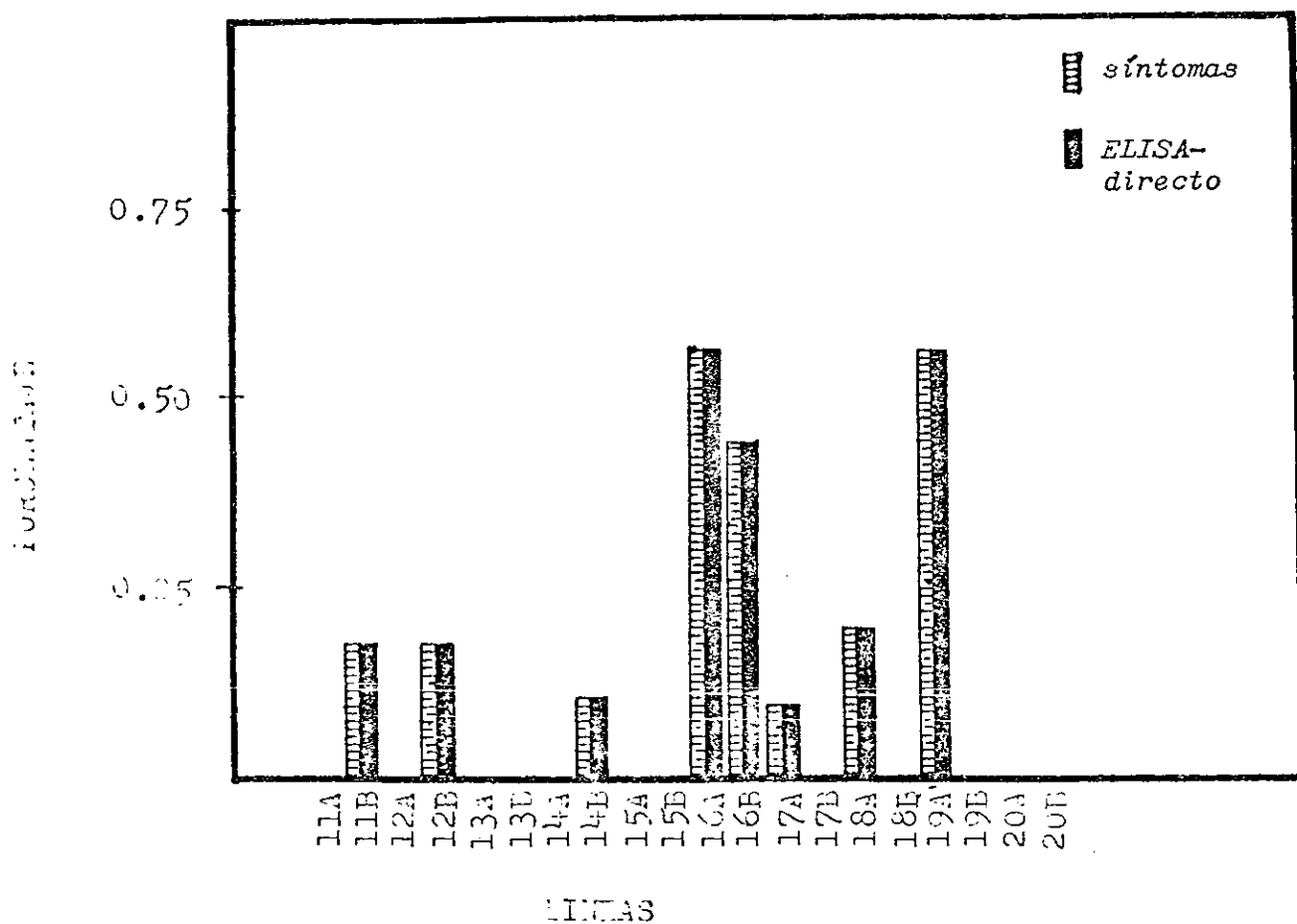


Fig. 5 Representación de los porcentajes de infección por línea en síntomas y ELISA-directo.

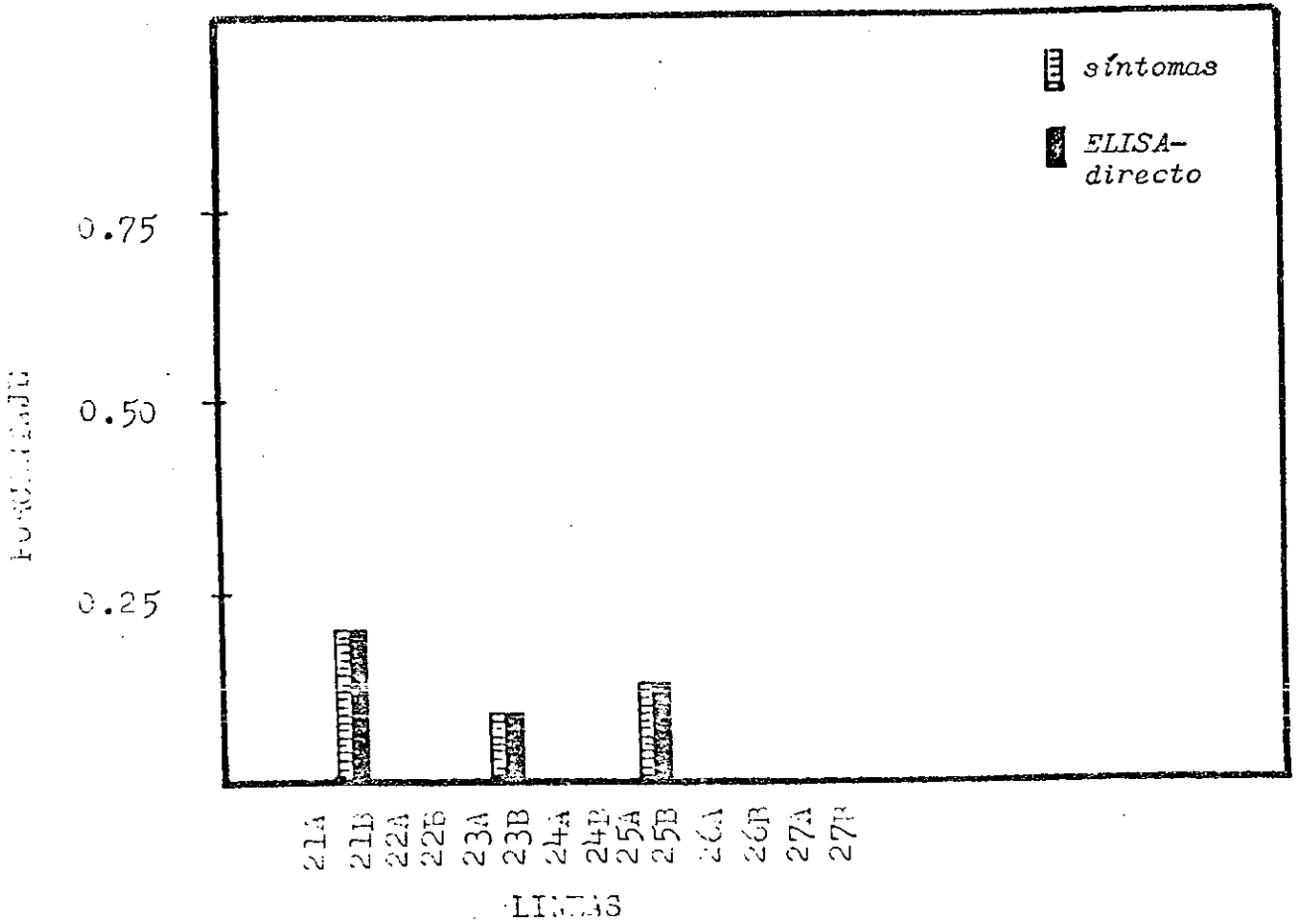


Fig. 6 Representación de los porcentajes de infección por Zinea en síntomas y ELISA-directo.

Cuadro 2 Placas de ELISA-directo y ELISA-indirecto con datos de valor promedio, desviación standard, líneas, coeficiente de variación.

LÍNEAS	PLACA (PRV)	$K\bar{c}$ valor promedio	Kc^{\dagger} desv. standard	$C.V.$ (%)
1A, 1B, 2A, 2,B	15-83	0.355	0.063	17.75
2B, 4A.	16-83	0.442	0.058	13.12
3A, 3B, 4B, 5A.	17-83	0.393	0.079	20.10
5A, 5B, 6A, 6B.	18-83	0.350 ^m	0.055	15.71
7A, 7B, 8A.	19-83	0.331	0.044	13.29
8B, 9A, 9B, 10A, 10B.	20-83	0.203	0.047	23.16
11A, 11B, 12A.	22-83	0.514	0.153	29.77
12A, 12B, 13A.	23-83	0.440	0.070	15.91
13B, 14A, 14B, 15A.	24-83	0.811	0.102	12.58
15A, 15B, 16A, 16B.	25-83	0.751	0.195	25.97
16B, 17A, 17B, 18A.	26-83	0.692	0.087	12.57
18B, 19A, 19B, 20A.	27-83	0.264	0.021	7.96
20A, 21A, 21B, 22A.	28-83	0.386	0.079	20.47
22A, 22B, 23A.	29-83	0.252	0.064	25.40
24A, 24B, 25A.	30-83	0.206	0.065	31.55
25A, 25B, 26A, 26B.	31-83	0.175	0.037	21.14
26B, 27A, 27B.	32-83	0.250	0.078	31.20
varias	33-83	0.337	0.049	14.54
no infect.	I 01-83	0.709	0.067	9.45
no infect.	I 02-83	0.232	0.035	15.09
varias	I 03-83	0.302	0.041	13.58
no infect	I 04-83	0.202	0.042	20.79

I = ELISA-indirecto

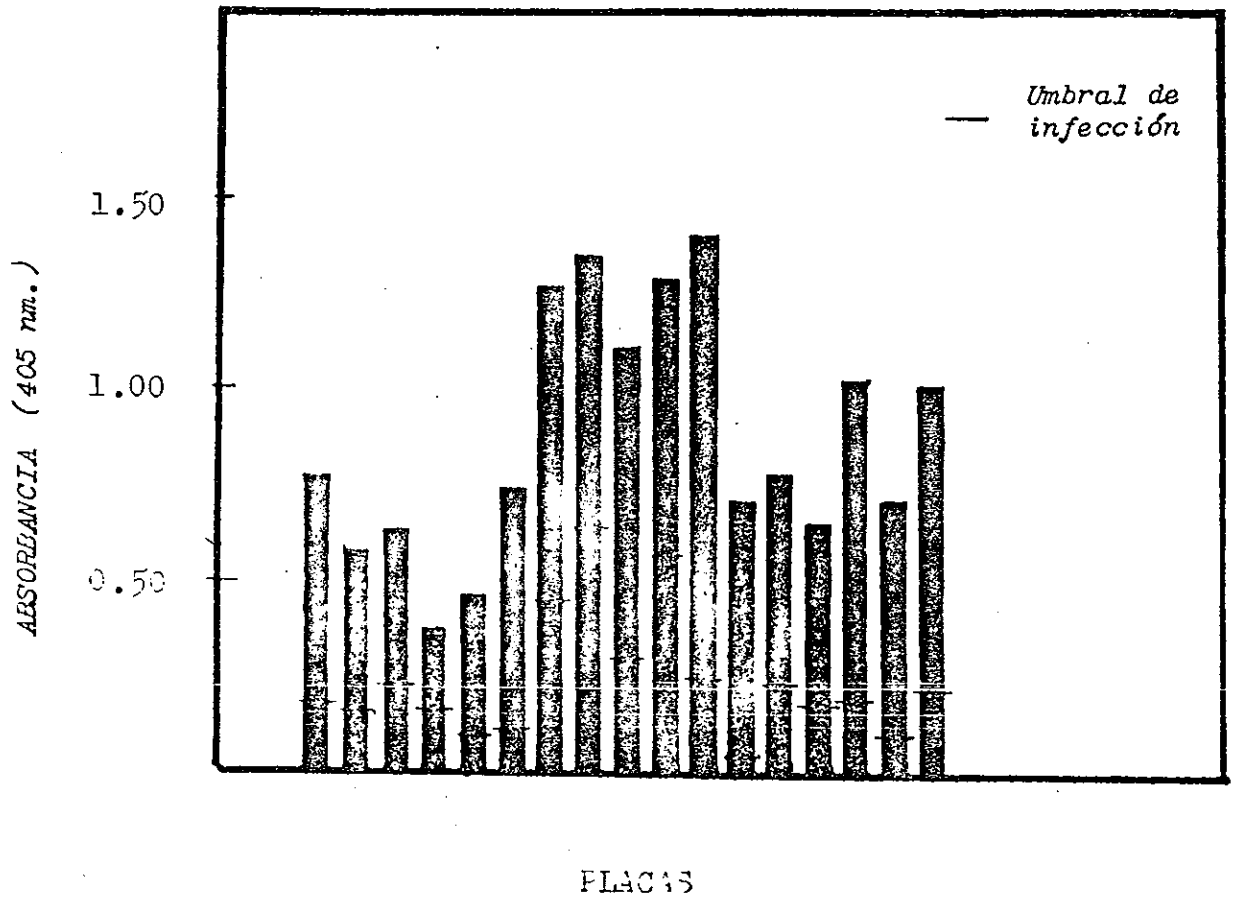


Fig. 7

Controles positivos de cada placa y sus respectivos umbrales de infección.

tras fueron consideradas positivas y la magnitud en la que el control positivo sobrepasó ese punto en cada una de las placas sometidas a estudio.

El rango de variación obtenido en absorbancia dentro de una misma línea varió de 0.04 en la menor hasta 1.62 en la mayor, figuras 8 y 9.

De los resultados obtenidos al emplear la técnica ELISA-directa se detectó que algunos son contradictorios respecto a los síntomas presentes en las plantas. No obstante se correlacionaron con el porcentaje de infección proporcionado por los síntomas visuales. La correlación y ecuación de regresión dieron los valores de 0.879 y $Y = 0.966X + 0.012$ respectivamente, lo que indica una alta correlación entre ambos porcentajes de infección, figura 10.

Todos aquellos resultados dudosos se volvieron a reevaluar por ELISA de manera que la nueva correlación y ecuación de regresión fueron 0.998 y $Y = 1.002X + (-0.002)$, lo que significa una correlación extremadamente alta, figura 11.

Los tres valores más altos de todas aquellas plantas (líneas) con grado de infección nulo están en su mayoría por debajo del umbral de infección de forma palpable, como puede observarse en la figura 12.

2. Por el método de ELISA-indirecto los tres valores más altos obtenidos con ELISA-directo fueron corridos por ELISA-indirecto. En su mayoría corroboraron el grado nulo de infección de las líneas a excepción de cuatro líneas, 4A, 10B, 11A y 17B, figura 13. Las que al momento de esta prueba ya presentaban síntomas visuales; mientras que

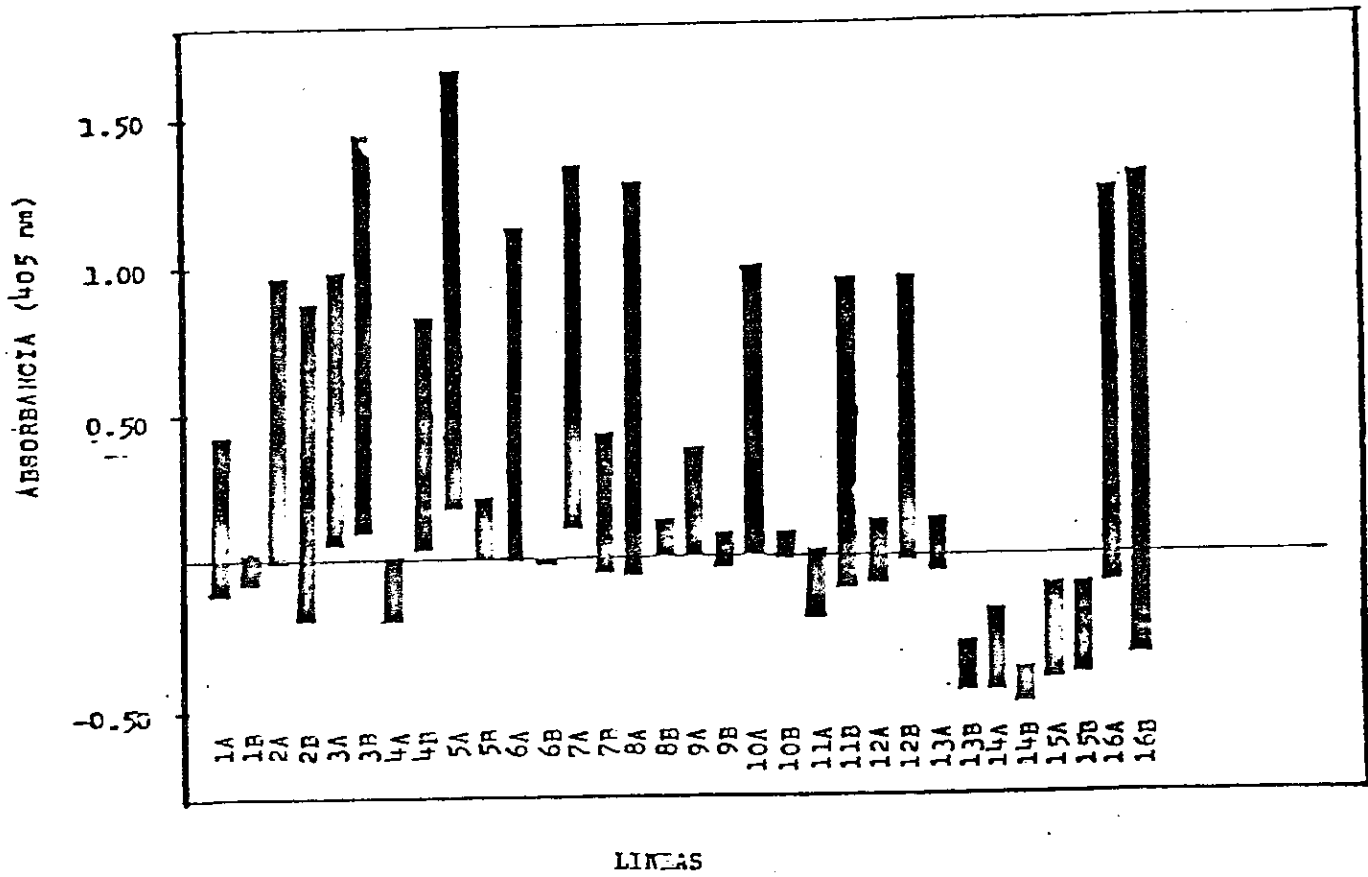


Fig. 8 Representación del rango entre la mayor y menor lectura de cada línea por ELISA-directo.

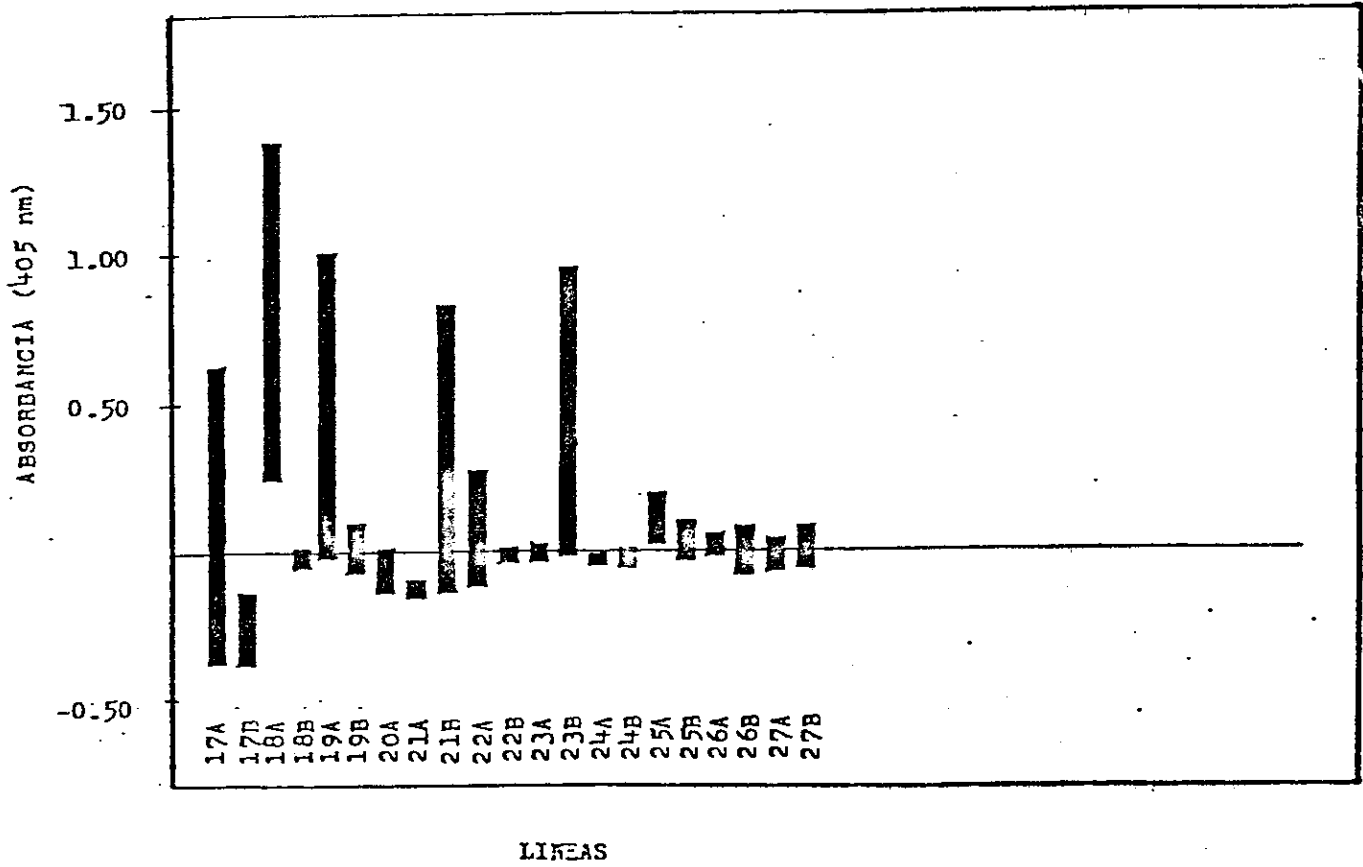


Fig. 9 Representación del rango entre la mayor y menor lectura de cada línea por ELISA-directo.

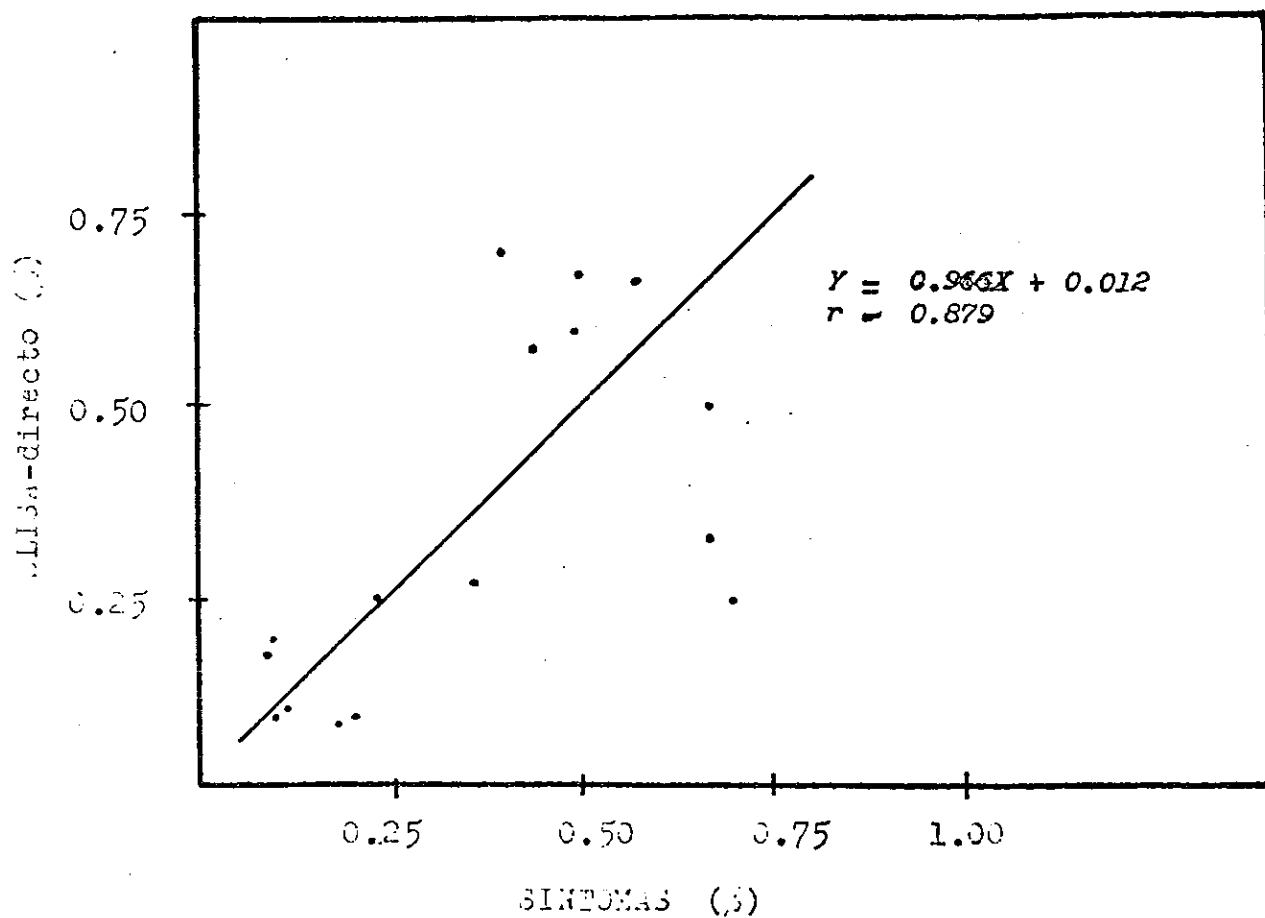


Fig. 10 Regresión lineal y correlación entre porcentajes de plantas infectadas con síntomas y ELISA-directo (sin corrección de resultados dudosos).

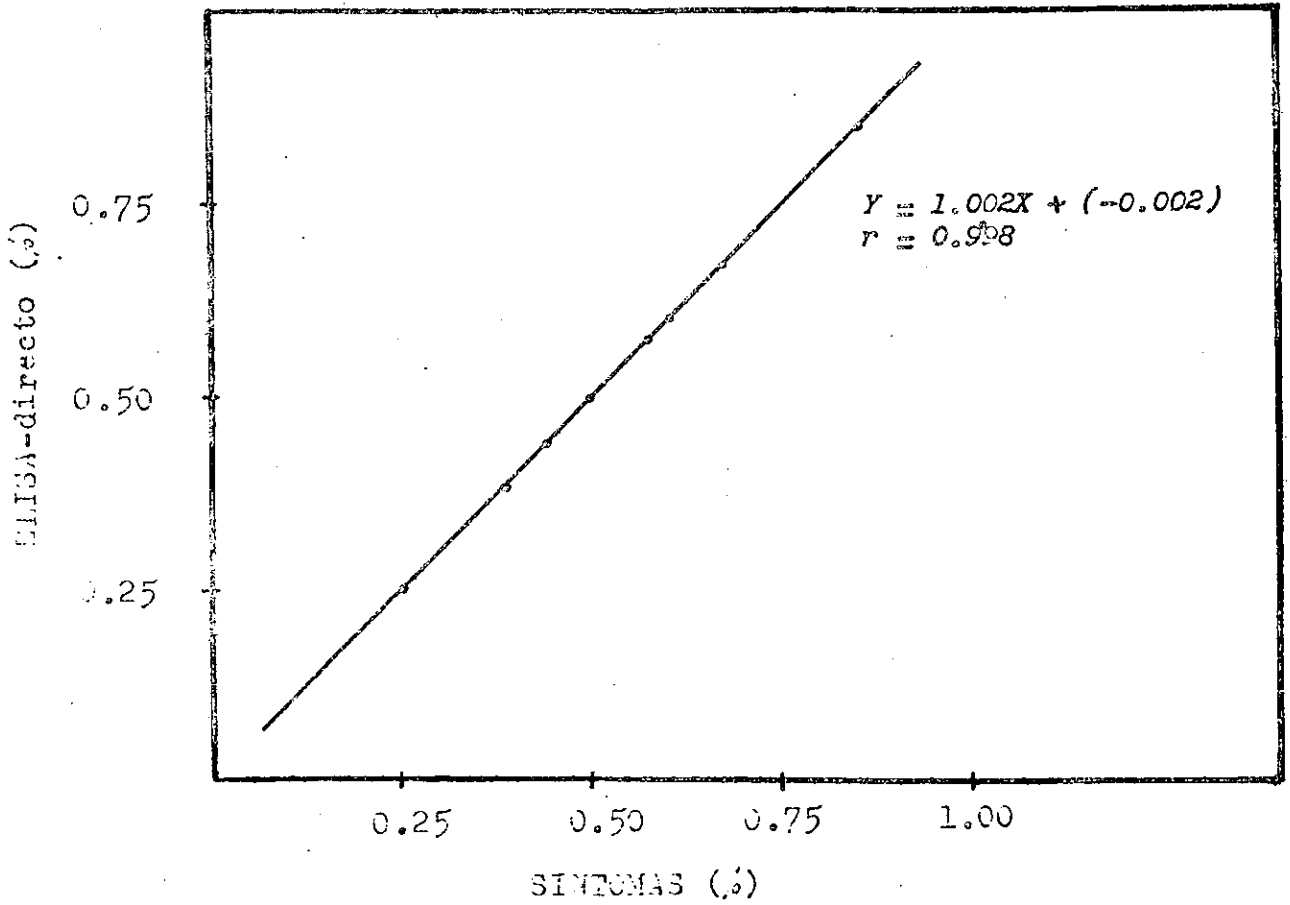


Fig. 11 Regresión y correlación entre porcentajes de plantas infectadas con síntomas y ELISA-directo (con corrección de resultados dudosos).

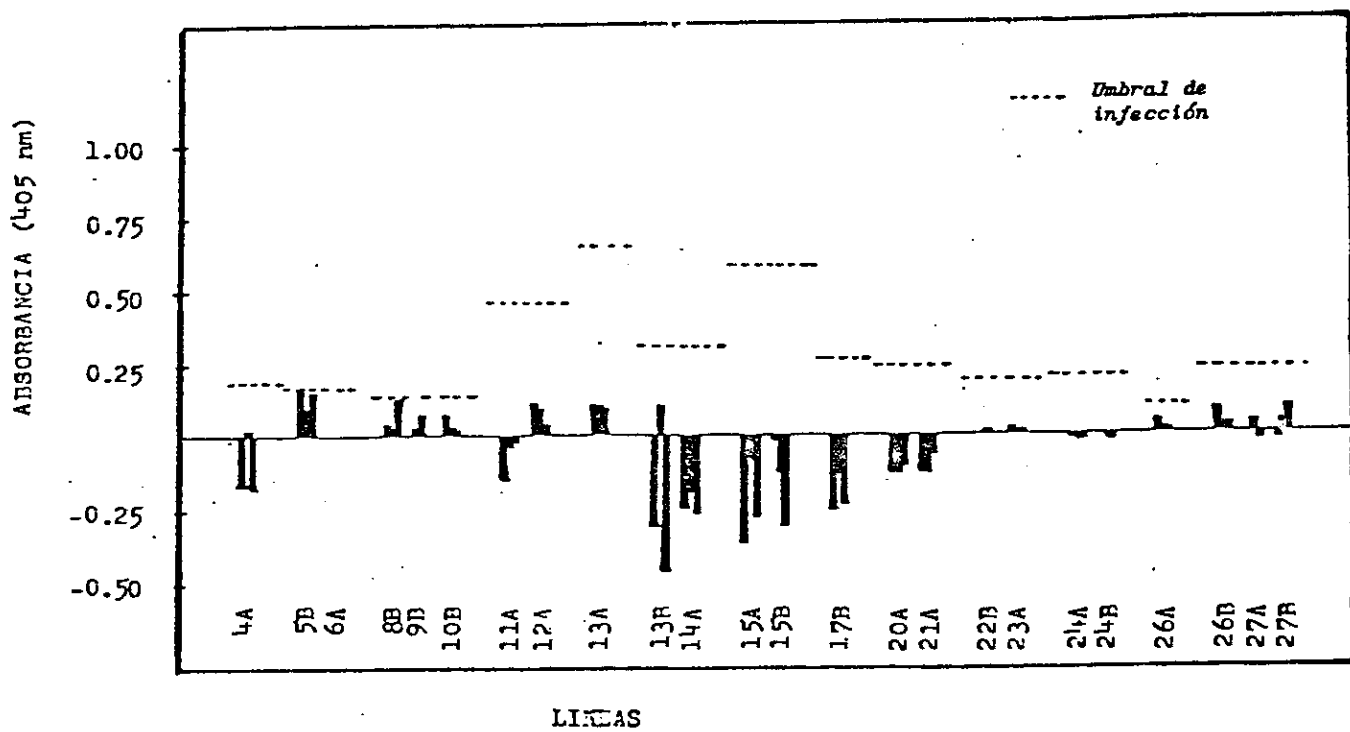


Fig. 12 Representación de los tres valores más altos de las plantas con resultado negativo en ELLSA-directo.

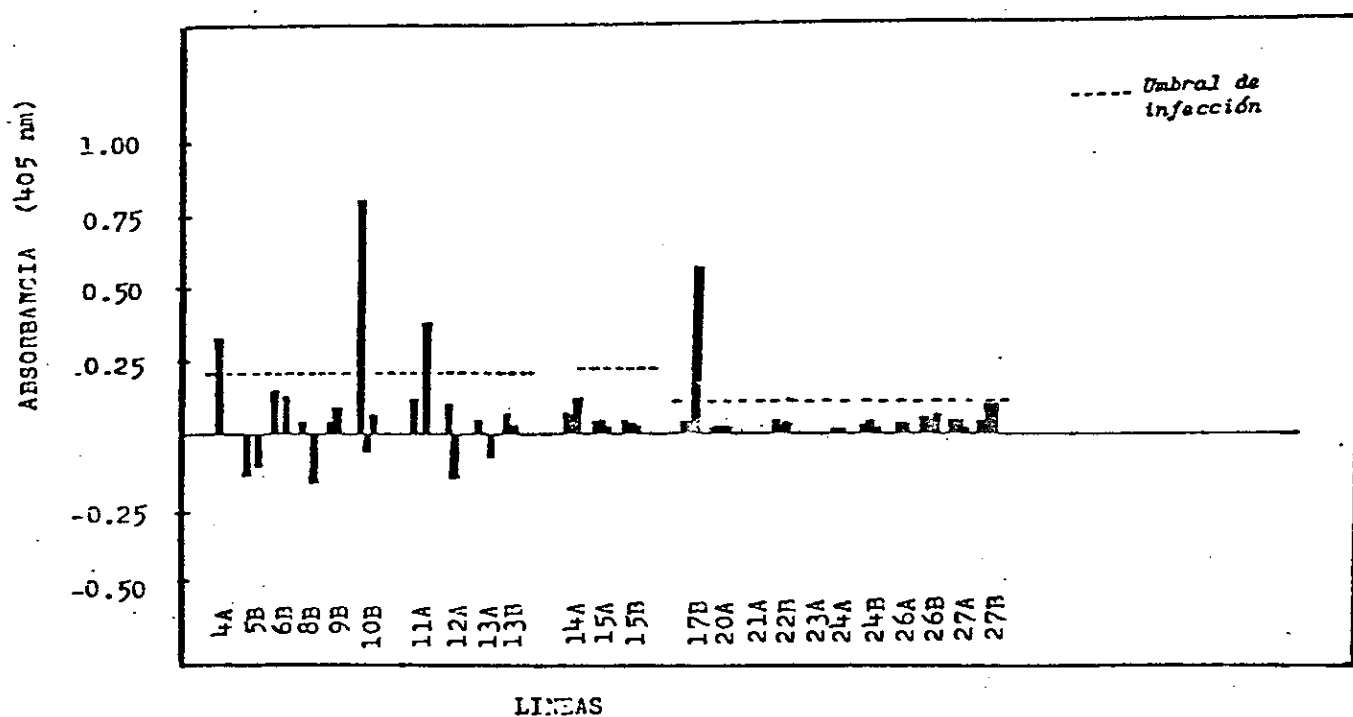


Fig. 13 Representación de los tres valores más altos (plantas) con resultado negativo en ELISA-directo, ahora en ELISA-indirecto.

cuando se hizo con ELISA-directo si ya ocurría la infección, no fue detectable. No obstante, la diferencia en tiempo entre una y otra prueba fue en el menor de los casos de 45 días. Además la infección se presentó en dichos casos en una de las plantas únicamente.

Las mismas muestras que fueron utilizadas para la corrección de aquellos resultados dudosos en ELISA-directo fueron reevaluadas con ELISA-indirecto con el propósito de medir la correlación entre ambos métodos. Los resultados de dicha relación son de 0.923 y $Y = 1.548X \pm 0.039$ para correlación y ecuación de regresión respectivamente. Lo que indica un alto índice de correlación entre uno y otro método, figura 14.

C. Mecanismos de diagnóstico del VMCar en viveros comerciales y plantaciones adultas

1. Cálculo del tamaño de las muestras

La desviación standard de población obtenida como la media aritmética de las desviaciones standard a partir de cada placa individual fue de 0.170, que usado en la Ecuac. 1 dió como resultado el número de muestras requerido a los diferentes niveles de confianza y errores muestrales máximos. Los que fueron convertidos a el número de muestras necesario de acuerdo a los distanciamientos de siembra, Cuadro 3 y número de plantas en vivero, Cuadro 4. Los niveles de confianza usados fueron 0.997, 0.955 y 0.683. Y los errores muestrales se consideraron desde 0.05, 0.10, 0.15 hasta 0.20.

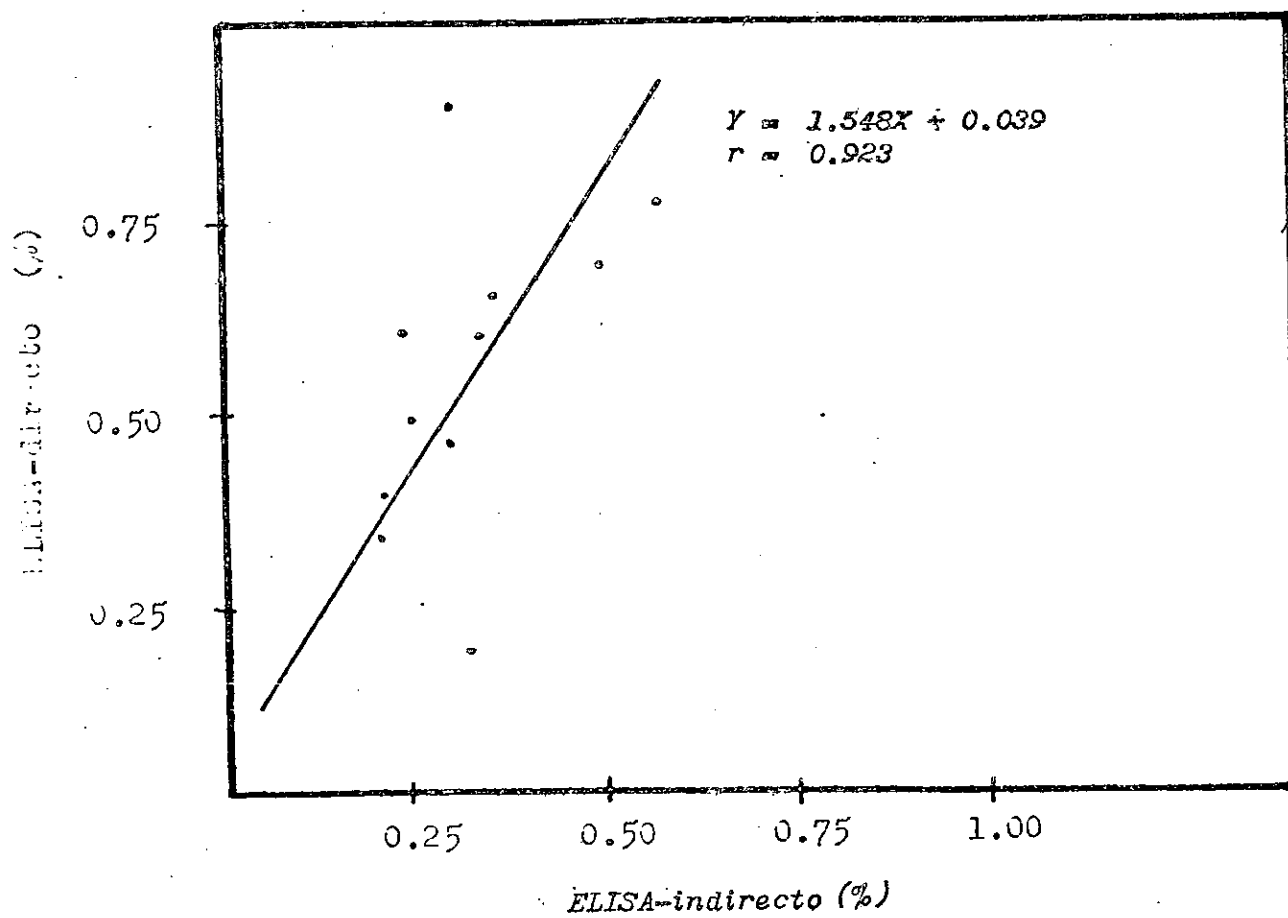


Fig. 14 Regresión lineal y correlación en absorbancia por ELISA-directo y ELISA-indirecto, (con muestras de la misma hoja y planta).

CUADRO No.3 NUMERO DE MUESTRAS A RECOLECTAR POR HECTAREA, A UN NIVEL DE CONFIANZA Y ERROR MUESTRAL MAXIMO DADOS.

Dist. $\frac{a}{b}$	0.997				0.955				0.683			
	0.05	0.10	0.15	0.20	0.05	0.10	0.15	0.20	0.05	0.10	0.15	0.20
3.0 x 1.5	515	129	57	32	229	57	25	14	57	25	6	4
3.0 x 2.0	386	97	43	24	172	43	19	11	43	19	5	3
3.0 x 2.5	309	77	34	19	137	34	15	9	34	15	4	2
3.0 x 3.0	258	64	29	16	115	29	13	7	29	13	3	2
3.5 x 1.5	441	110	49	28	196	49	22	12	49	22	5	3
3.5 x 2.0	331	83	37	21	147	37	16	9	37	16	4	2
3.5 x 2.5	265	66	29	17	118	29	13	7	29	13	3	2
3.5 x 3.0	221	55	25	14	98	25	11	6	25	11	3	2
4.0 x 1.5	386	97	43	24	172	43	19	11	43	19	5	3
4.0 x 2.0	290	72	32	18	129	32	14	8	32	14	4	2
4.0 x 2.5	232	58	26	14	103	26	11	6	26	11	3	2
4.0 x 3.0	193	48	21	12	86	21	10	5	21	10	2	1
4.5 x 1.5	343	86	38	21	153	38	17	10	38	17	4	2
4.5 x 2.0	258	64	29	16	115	29	13	7	29	13	3	2
4.5 x 2.5	206	51	23	13	92	23	10	6	23	10	3	1
4.5 x 3.0	172	43	19	11	76	19	8	5	19	8	2	1
5.0 x 1.5	309	77	34	19	137	34	15	9	34	15	4	2
5.0 x 2.0	232	58	26	14	103	26	11	6	26	11	3	2
5.0 x 2.5	185	46	21	12	82	21	9	5	21	9	2	1
5.0 x 3.0	155	39	17	10	69	17	8	4	17	8	2	1

a = Nivel de confianza

b = Error muestral máximo

JUADRO No.4 NUMERO DE MUESTRAS A RECOLECTAR DE ACUERDO AL NUMERO DE PLANTAS EN VIVERO, A UN NIVEL DE CONFIANZA Y ERROR MUESTRAL MAXIMO DADOS.

No. plantas	a b	0.997				0.955				0.683			
		0.05	0.10	0.15	0.20	0.05	0.10	0.15	0.20	0.05	0.10	0.15	0.20
500		116	29	13	7	51	13	6	3	13	3	1	1
1000		232	58	26	14	103	26	11	6	26	6	3	2
1500		348	87	39	22	154	39	17	10	39	10	4	2
2000		463	116	51	28	206	51	23	13	51	13	6	3
2500		579	145	64	36	257	64	29	16	64	16	7	4
3000		695	174	77	43	309	77	34	19	77	19	9	5
3500		811	203	90	51	360	90	40	23	90	23	10	6
4000		927	232	103	58	412	103	46	26	103	26	11	6
4500		1043	261	116	65	463	116	52	29	116	29	13	7
5000		1159	290	129	72	515	129	57	32	129	32	14	8
6000		1390	348	154	87	618	154	69	39	154	39	17	10
7000		1622	406	180	101	721	180	80	45	180	45	20	11
8000		1854	463	206	116	824	206	92	51	206	51	23	13
9000		2085	521	232	130	927	232	103	58	232	58	26	14
10000		2317	579	257	145	1030	257	114	64	257	64	29	16
15000		3476	869	386	217	1545	386	172	97	386	97	43	24
20000		4634	1159	515	290	2060	515	229	129	515	129	57	32
25000		5793	1448	644	362	2575	644	286	161	644	161	71	40
50000		11586	2896	1287	724	5149	1287	572	322	1287	322	143	80
100000		23171	5793	2575	1448	10298	2575	1145	644	2575	644	285	160
250000		57929	14482	6475	3619	25746	6475	2862	1609	6475	1609	713	401

a - Nivel de confianza
b - Error muestral máximo

2. Número de muestras a evaluar por placa

Se utilizaron 200 muestras, las que fueron distribuidas al azar en grupos de 20. Quedando los grupos y los controles negativo y positivo en las orillas. El análisis de varianza rechaza la hipótesis de las medias de absorbancia, fueran iguales a un nivel de 0.01 como puede verse en el Cuadro 5.

El cuadrado medio entre bloques fue de 0.010 que indica que la - gradiente respecto a bloques fue mínima.

Al hacer una diferenciación de medias por medio del comparador - D.S.H. de Tukey se ve claramente que sólo el control positivo es diferente estadísticamente y que los valores de las muestras son iguales - a la media de los controles negativos, Cuadro 6.

Cuadro 5 Análisis de varianza respecto de las muestras de viveros comerciales

	G.L.	C.M.	F.C.	F.T.	
				0.05	0.01
Muestras	11	0.138	34.5**	2.16	2.98
Bloques	3	0.010			
Error	33	0.142			
C.V. 15.81					

** diferencia significativa al 0.01.

Cuadro 6 Valores promedio de las absorbancias de muestras compuestas por 20 sub-muestras cada una.

Muestras	Absorbancia (405 nm)
$K\bar{c}$	0.335 a
$K\hat{c}$	0.982 b
1	0.369 a
2	0.363 a
3	0.363 a
4	0.365 a
5	0.372 a
6	0.302 a
7	0.381 a
8	0.304 a
9	0.301 a
10	0.365 a

$K\bar{c}$ = representa el valor de la planta sana usada como control negativo

$K\hat{c}$ = representa el valor de una planta enferma con 19 sanas, usada como control positivo.

V. DISCUSION

El problema provocado por el VMCar ha tomado dimensiones extraordinarias, a tal grado que en la Costa Sur no hay plantación de cardamomo que no se encuentre infectado, debido a que la producción decrece rápidamente, se corre el peligro de que el cultivo de cardamomo desaparezca definitivamente al continuar la infección viral en forma incontrolada. Puesto que se trata de un virus no hay cura química ni terapéutica. La única forma de control es por medio de estrategias que ayuden en la erradicación del agente viral, por medio de resistencia varietal o convivencia con el patógeno de manera que permita una rentabilidad conveniente en el cultivo de esta especie.

Encontrar resistencia es la forma ideal de control para las enfermedades virales. Sin embargo, es una estrategia a largo plazo y en cierto modo complicada. No obstante, el punto de partida es la obtención de plantas con características de resistencia, con las cuales debe iniciarse un trabajo intensivo de evaluación de la susceptibilidad de dicho material promisorio. La selección es un proceso largo pues las plantas con resistencia son aquellas con las peores características agronómicas, de tal suerte que deben ser sometidas a fitomejoramiento con el propósito de obtener líneas que al mismo tiempo sean resistentes y altamente productivas.

Encontrar plantas aparentemente sanas en plantaciones con alta incidencia del VMCar es bastante difícil y poco probable. La apariencia sana del material encontrado se debe a un número no determinado de fac

tores. Por esa razón las plantas o el material que se sometió a la inoculación natural y que presenta alguna resistencia a la enfermedad debe tomarse como válido sólo para las condiciones de la estación experimental. Pues mientras no se haga una evaluación de la amplitud de la resistencia encontrada no se pueden extrapolar resultados a otras condiciones. Además, a pesar de que la estación se encuentre en un lugar adecuado en cuanto a incidencia, severidad y uniformidad de la infección del virus, el tiempo empleado en este trabajo no fue suficiente para evaluar el material en forma concreta. De manera que es solamente promisorio, debe continuarse la evaluación y ser sometido a una mayor presión de selección, ya sea por inoculación mecánica o por áfidos virulentos. Hasta el momento el número de líneas que presenta un porcentaje de infección nulo es alto, lo que es bastante satisfactorio. Por otra parte, el porcentaje de infección presentado por las otras líneas no sobrepasa el 50% en la mayor parte de los casos. Esto puede tomarse como un grado de tolerancia según la etapa en la cual se encuentran las plantas.

La correlación encontrada entre la técnica de detección ELISA y los síntomas a nivel de vivero en la prueba de resistencia ha sido tan alta que la búsqueda de tal resistencia podría facilitar una evaluación más periódica de las líneas con solamente los síntomas visuales. Sin embargo, de cualquier forma la importancia de ELISA radica en que se ha detectado presencia del virus en material con apariencia sana. Esto sería de vital importancia sobre todo al momento de la siembra de material totalmente limpio.

La correlación encontrada entre los dos métodos de diagnosis sugiere, en base a la especificidad de ELISA-directo y a la amplitud de detectar cepas muy relacionadas de ELISA-indirecto, de que solamente hay una cepa o raza del virus en Guatemala.

El cálculo del tamaño de las muestras para diagnosis del VMCar a partir de la desviación standard, de la población completa de las plantas presentes en el vivero de prueba de susceptibilidad, se basó en los datos obtenidos por el método de ELISA-directo. En vista de la correlación encontrada entre este método y ELISA-indirecto, es posible utilizar la misma desviación para el cálculo de las muestras a evaluar en el diagnóstico del VMCar.

VI. CONCLUSIONES

En plantas seleccionadas, aparentemente sanas a nivel de campo, se detectó la presencia del virus por medio de ELISA-directo.

Los métodos ELISA-directo y el indirecto dieron una correlación - extremadamente alta con respecto a los síntomas visuales a nivel de vivero de prueba de susceptibilidad.

De las 54 líneas evaluadas, provenientes de la selección a nivel de campo, 24 presentaron un porcentaje de infección nulo después de - ocho meses de presión de selección natural en un área con alta incidencia y de infección severa y uniforme.

La técnica ELISA-indirecto es un útil instrumento para el diagnóstico de viveros comerciales y plantaciones adultas, ya que su sensibilidad permite analizar lotes de muestras agrupados en unos pocos, de - manera que la cantidad de muestras a evaluar es estadísticamente representativa y con un ahorro de reactivos bastante considerable.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. ABRAHAM, P. Now better possibilities with cardamomo. *Plant. Chron.* 52,3: 65,73. 1957.
2. AMATO, S.A. et al. El ensayo inmunoabsorbente enzima conjugada (ELISA) en el diagnóstico de rotavirus. *Rev. Med. Hosp. Nac. Niños* 12 (2): 73-78. 1977.
3. AMEZQUITA, M.O. Técnicas de producción utilizadas en el cultivo del cardamomo (*Elettaria cardamomum*), según tamaño de explotación agrícola en Alta Verapaz. Tesis de Ing. Agr., Guatemala, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1978. p. 57.
4. AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use for conjugates of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6: 43-52. 1969.
5. BAR-JOSEPH, M. et al. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69: 190-194. 1979.
6. CARROLL, T.W., P.L. Gosseland & E.D. Hockett. Resistance to cucumber mosaic virus transmission by aphids in Cucumis melo. *Phytopathology* 69: 1223-1225. 1979.
7. CLARK, M.F. & A.N. Adams. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483. 1977.
8. CLARKE, R.G., R.H. Converse & M. Kojima. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect potato leafroll viruliferous aphids. *Plant*

Disease 64: 43-45. 1980.

9. CONTI, M. & F. SACCARDO. *Testing some american lines of pepper for resistance to cucumber mosaic virus. Italian Isolates. Page 19 en: Second International Conference on Progres and Problems in - Vegetable Virus Research. 15-18 sept. 1975-Avignon-Monfavet, - France. 1975. p. 44.*
10. COOK, A.A. *Genetics of response in pepper to three strains of - Potato Virus Y. Phytopathology 53: 720-722. 1963.*
11. COONS, G.H. *Breeding for resistance to disease. U.S. Dept. of Agric. Plant Diseases 174-191. 1953.*
12. CROOK, N.E. & C.C. Payne. *Comparison of three methods of ELISA for baculoviruses. J. Gen. Virol. 46: 29-37. 1980.*
13. CROWTHER, J.R. & E.M. Abu-el Zein. *Detection and cuantification of root and mouth disease virus by enzime labelled immunosorbent assay techniques. J. Gen. Virol. 42: 597-602. 1979.*
14. DARLIGTON, C.D. & A.P. Wylie. *Chromosome atlas of flowering plants. London. George Allen & Unwin. 1955.*
15. DESHPANDE, R.S., C. SIDDAPPAJI & S. VISWANATH. *Epidemiological - studies on "Katte" disease of Cardamom (Elettaria cardamomum - Maton). Mys. J. Agric., Sci., 6: 4-9. 1972.*
16. DIEZ, M. *Diagnóstico del virus del mosaico del cardamomo utilizando la técnica enzima conjugada (ELISA). Tesis Ing. Agr., Guatemala, Depto. de C. Agrícolas, Universidad del Valle de Guatemala. 1982. p. 50.*

17. DIMITMAN, J. *An aphid transmitted viruses of cardamom on Guatemala.* *Phytopathology Abstracts* 71: 104. 1981.
18. FLORES, M.D. *El mosaico del cardamomo.* La Cámara del Agro Guatemala, C.A. 1980.
19. GIBBS, A. & B. HARRISON. *Plant virology, the principles.* 1st Ed. Edward Arnold. Great Britain. 1976.
20. GILPATRICK, J.D. & M. WEINTRAUB. *An usual type of protection with the carnation mosaic virus.* *Science* 115: 701-702. 1952.
21. GONSALVES, D. *Indirect ELISA for cardamom mosaic virus.* *Laboratory notes.* New York State Agricultural Experiment Estation, - Cornell University. New York. 1983. p. 2.
22. GONSALEZ, E. *El cultivo del cardamomo.* Ministerio de Agricultura, Guatemala, C.A. 1977. p. 16.
23. GUATEMALA CAMARA DEL AGRO DE. *Vol I, No. 7.* Guatemala C.A. 1979. p. 6-12.
24. GUATEMALA, BANCO DE. *Informe económico.* Abril sept. 1979. Guatemala, C.A. 1979. p. 68.
25. JAMES, W.C. *Assessment of plant disease and losses.* *Annu. Rev. Phytopatol.* 12: 27-28. 1974.
26. KOOLSTRA, E. *Significance of the non-appearance of visible disease symptoms in cucumber (Cucumis sativa L.) after infection with - cucumis virus 2.* *Euphytica* 17: 136-140. 1968.
27. KULKARNI, G.S. *Mosaic and other related diseases of crops in de Bombay Presidency.* *Pound Agric. Coll. Mag.* XVI, 1: 6-12. 1924.

28. KRUPINSKY, J.M. & E.L. SHARP. Resection for improved resistance of wheat to stripe rust. *Phytopathology* 69: 400-404. 1979.
29. LEACH, S.S. Resistance of selected potato cultivars and clones - to fusarium dry rust. *Phytopathology* 71: 623-629. 1981.
30. LECOQ, H., M. PITRAT & G. LABONNE. Resistance to cucumber mosaic virus transmission by aphids in Cucumis melo. *Phytopathology* 69: 1223-1225. 1979.
31. LISTER, R.M. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting viruses in soybean seed and plants. *Plants. Phytopathology* 68: 1393-1400. 1978.
32. LISTER, R.M. & W.F. ROCHOW. Detection of barley yellow dwarf - virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 69: 649-654. 1979.
33. LOEBENSTEIN, G. Inhibition, interference and acquired resistance during infection. In Principles and techniques in plant virology. Van Nostrand Reinhold Company. New York, U.S.A. 1972. p. 32-61.
34. LOMMEL, S.A., A.H. MCLAIN & T.J. MORRIS. Evaluation of indirect - enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* 72: 1018-1022. 1982.
35. MARCO, S. & S. COHEN. Rapid detection and titer evaluation of - viruses in pepper by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 69: 1259-1262. 1979.
36. MINK, G.I. Identification of rugose mosaic-diseased cherry trees by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease* 64: 641-694. 1980.

37. MORTON, J.B. & D.E. MATHRE. Identification of resistance to *Cephalosporium stripe* in winter wheat. *Phytopathology* 70: 812-817. 1980.
38. OVERDICK, F.J. *El cultivo y beneficio práctico del cardamomo*. - Tesis, Escuela de Agricultura Barcenás, Villa Nueva. Guatemala, C.A. 1960.
39. PARRY, J.W. *The spices handbook*. 1st. Ed. Chemical Publishing Co., Inc. New York. 1945. p. 254.
40. PARRY, J.W. *Spices*. Vol I and II. Chemical Publishing Co., Inc. New York. 1969. p. 235 and 245.
41. SAHASRABUDDHE, D.L. *The spices garden of Sirsi in Kanhra*. Dep. of Agri. Bombay Bol. No. 83. Chapter 5. 1917.
42. SHANMUGANATHAN, N. & G. FLETCHER. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect fanleaf virus in grapevines grown in containers. *Plant Disease* 66: 704-707. 1982.
43. SUNDERWIRTH, S.D. & A.P. ROELFS. Green house evaluation of the plant resistance of Sr2 to wheat stem rust. *Phytopathology* 70: 634-637. 1980.
44. UPPAL, B.N., P.M. VARMA & S.P. CAPOOR. A mosaic disease of cardamom. *Curr. Sci.*, 13: 284-285. 1945.
45. UYEMOTO, J.K. Detection of maize chlorotic mottle virus serotypes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 70: 290-292. 1980.
46. VAN REGENMORTEL, M.H.V. & J. BURCKARD. Detection of a wide -

- spectrum of tobacco mosaic virus strains by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Virology* 106: 327-334. 1980.
47. VARMA, P.M. & S.P. CAPOOR. Mosaic disease of cardamom and its transmission by the banana aphid. *Indian J. Agri. Sci.*, 28: 97-108. 1958.
48. VARMA, P.M. The banana aphid (*Pentalonia nigronervosa*) and the transmission of "Katte" disease of cardamom. *Indian Phytopath.* 15, 1: 1-10. 1962.
49. VOLLER, A., et al. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* 33: 165-167. 1976.
50. WINGARD, S.A. The nature of resistance to disease. *U.S. Dept. of Agric. Plant Diseases* 174-191 p. 1953.
51. WILLIS, J.C. A dictionary of the flowering plants and ferns. 7th Ed. (Rev. by H.K. Airey Shaw). Cambridge Univ. Press. 1966.