

BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Ciencias Agrícolas

TRANSMISION MECANICA DEL VIRUS  
DEL MOSAICO DEL CARDAMOMO (VMCar)

RADU VIRGIL BADULESCU VALLE

Guatemala

1985

BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

TRANSMISION MECANICA DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL  
CARDAMOMO (VMCar).

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Ciencias Agrícolas

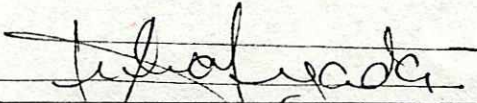
TRANSMISION MECANICA DEL VIRUS  
DEL MOSAICO DEL CARDAMOMO (VMCar)

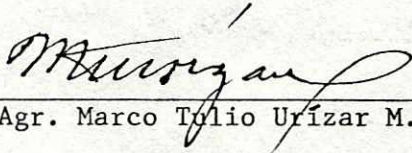
RADU VIRGIL BADULESCU VALLE

Trabajo de Investigación presentado para optar al Título  
de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico  
de Licenciado en Ciencias Agrícolas


Guatemala, 1985

Vo. Bo.

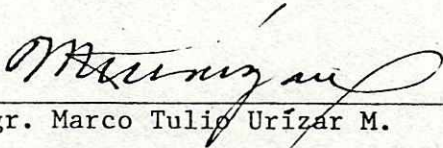
(f)   
Ing. Julio Roberto Tejada Castillo (Ms.Sc.)

(f)   
Ing. Agr. Marco Tulio Urizar M.

Comité de Tesis:

(f)   
Ing. Julio Roberto Tejada Castillo (Ms.Sc.)

(f)   
Ing. Agr. Carlos Rodolfo Peláez L.

(f)   
Ing. Agr. Marco Tulio Urizar M.

Fecha de aprobación: Noviembre 1985

A mis padres:

Ing. Civil Dan Badulescu Bejan  
Berta Valle de Badulescu

A mis hermanas:

Elba y Doina

A mi abuelita:

Florinda Ovalle Velasquez

A mis amigos

A mis compañeros:

Del Instituto Austríaco Guatemalteco (XIII Promoción).

A las personas e instituciones que me ayudaron en la realización de este trabajo.

Universidad del Valle de Guatemala (U V G)

Asociación de Productores de Cardamomo (APROCAR)

Los Ingenieros Julio R. Tejada, Marco Tulio Urizar y Miguel Angel Canga-Argüelles.

Mis compañeros de trabajo del programa "APROCAR-UVG" y amigos:

Ingenieros Oscar Bonilla, César Menéndez, Marco Arévalo, Rolando Mejía, Sabrina Castillo, Claudia Marroquin, Patricia De León, Lilian García, Rigoberto Castañeda, Carlos Mendoza, Victor Monroy.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	6
A. El Cultivo del Cardamomo	6
1. Características botánicas	6
2. Ecología del cultivo	10
3. Importancia económica	10
B. La Enfermedad del Mosaico del Cardamomo	14
C. Técnicas Serológicas	15
D. La Técnica inmunosorbente enzima conjugada (ELISA)	16
1. Fundamentos de la Técnica ELISA	16
2. Condiciones de la Técnica ELISA	17
3. Tipos o clases de ELISA	17
4. Análisis de las muestras	19
E. Transmisión de Virus	20
1. Por vectores	20
2. Por tutores	22
3. Por injerto	24
4. Por semilla	26

5. Mecánica	28
6. Por polén	34
7. Por Nemátodos	34
8. Por hongos	35
F. Inhibición e interferencia del Virus	36
III. MATERIALES Y METODOS	38
A. Reactivos	38
B. Procedimiento de la Técnica de ELISA	38
1. Técnica de ELISA - directa	39
2. Técnica de ELISA - indirecta	43
C. Preparación de muestras a analizar con ELISA	45
1. Elisa - directa	45
2. Elisa - indirecta	46
D. Purificación de la Gama - globulina	46
E. Conjugación de la enzima con la Gama-globulina	47
F. Establecimiento del experimento	48
G. Establecimiento de la Metodología de Inolucación	50
a. Frotado de la hoja con Carborundum	51
b. Aire a presión más Carborundum	51
c. Inyectado en el tallo	55
d. Cortes en el tallo	55
e. Pinchazos en las hojas	55
H. Buffers	58
I. Tratamiento especial previo a la inoculación.	62

IV. RESULTADOS Y DISCUSION	65
V. CONCLUSIONES	73
VI. BIBLIOGRAFIA	75

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Datos estadísticos de la Embajada de los Estados Unidos de América, referente a productos nacionales exportados hacia dicho país.	12
2 Procentaje de plantas infectadas por el método de inoculación.	66
3 Porcentaje de plantas infectadas con los diferentes buffers.	67
4 Plantas infectadas por mes después de la inoculación mecánica, utilizando el buffer de fosfatos.	68
5 Plantas infectadas por mes después de la inoculación mecánica, utilizando el buffer de Tris.	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Tipos de injertos más útiles usados para la transmisión de virus.	27
2 Principio de la Técnica ELISA - directa.	40
3 Diagrama de distribución de muestras y controles en las placas de ELISA.	41
4 Principio de la Técnica ELISA - indirecta.	44
5 Aplicación del abrasivo Carborundum, para luego realizar la inoculación por el método de frotado de la hoja.	52
6 Método de inoculación de frotado de la hoja más Carborundum.	53
7 Método de inoculación de aire a presión más Carborundum.	54
8 Método de inoculación de inyectado en el tallo.	56
9 Método de inoculación por cortes en el tallo.	57
10 Método de inoculación por pinchazos en la hoja.	59
11 Sistema de lavado de plantas para la eliminación de exceso de macerado con virus después de las inoculaciones.	60
12 Vista parcial de las plantas inoculadas en el invernadero.	61
13 Pasos para determinar la presencia del virus del mosaico del cardamomo por inoculación mecánica.	64

## RESUMEN

El cardamomo (Elettaria Cardamomum) es un cultivo que por sus beneficios tanto para los agricultores como para la economía del país, ha adquirido últimamente una importancia e incremento espectacular, desafortunadamente este cultivo se ve afectado con perspectivas muy sombrías para la producción, por el Virus del Mosaico del Cardamomo (VMCar).

Debido a la rápida expansión y los peligros que presenta el VMCar para la producción nacional, varias instituciones científicas y privadas llevan a cabo estudios de investigación con el fin de encontrar, métodos de prevención y erradicación de ésta terrible enfermedad

El trabajo de investigación se ocupa de la transmisión mecánica del VMCar, fenómeno que ocurre en la naturaleza por medio del viento, agua, daños a la planta por animales y el hombre mismo.

Al comprobar cuál es el método de mayor incidencia en la propagación de la enfermedad, se podrán tomar medidas de protección para reducir la posibilidad de infestación por medio de los fenómenos naturales, equivalentes al método mecánico de mayor incidencia.

Los materiales y métodos utilizados han sido:

1. Plantas jóvenes de 90 a 120 días de edad.
2. Buffers de Mono-Disodio Hidroxifosfato, Tris-Hidroximetilamino metano.
3. Método de inoculación, que son:
  - a) Frotado de la hoja con Carborundum,
  - b) Aire a presión más Carborundum,
  - c) Inyectado en el tallo,
  - d) Cortes en el tallo,
  - e) Pinchazos en las hojas.
4. Métodos de identificación del VMCar en la planta que son ELISA directo e indirecto.

Los resultados obtenidos son que los métodos de mayor incidencia en la transmisión del VMCar son:

- Inyectado en el tallo	33.33 %
- Cortes en el tallo	33.33 %
- Aire a presión más Carborundum	33.33 %

Al quedar establecido que el virus se transmite efectivamente por medios mecánicos, concluimos que las formas de protección, serían rompevientos, distanciamiento adecuado para que hombres y animales al pasar por las plantas no las dañen y mantener un control de plagas como el áfido el cuál es un vector potencial en la transmisión del virus a la planta.

## I. INTRODUCCION

El cardamomo (Elettaria cardamomum Maton) es uno de los cultivos relativamente reciente, con especial importancia en Guatemala como producto de exportación.

A partir de los años 50, empezó a tener interés en las exportaciones y más recientemente, al final de la década de los setenta, ha llegado a convertirse en el tercer lugar como producto de exportación. A nivel mundial, Guatemala ocupa el primer lugar como exportador de esta especie (28).

Su introducción a Guatemala data desde 1920, en el Departamento de Alta Verapaz, en la región de Chisec, de donde el cultivo se propagó a otras regiones del mismo Departamento. Por las condiciones de clima y suelo aptos, se extendió a otras regiones del país. Aproximadamente, en los años cuarenta, se llevó a la Costa Sur y otras zonas (21).

En 1979, el área cultivada de cardamomo se estima en unas 16770 mil hectáreas (24 mil manzanas), con una producción de 3273 T.M. de cardamomo pergamino (28).

Ya en 1982, el área cultivada de cardamomo se estimó en 27,461.4 Ha, con una producción aproximada de 6,259.1 T.M., obteniéndose Q 44,233.100 por conceptos de exportación (24).

\* La hectárea = 1.43 Mz.

La tonelada métrica (T.M.) = 1000 Kg. = 2,204.6 Lb.

Para 1983 se tuvo una producción de 7750 T.M. (35).

En el período de agosto de 1983 a junio de 1984, Guatemala obtuvo por concepto de ventas de cardamomo un total de 62,605,311 dólares americanos con un volumen de exportación de 4,741.2 T.M., a un precio promedio de Q 600.2 por quintal de cardamomo en pergamino (23).

En enero de 1983 el área total cultivada con cardamomo en todo el mundo fue de 200,000 hectáreas (36).

Su producción está dividida en dos grandes zonas: la zona del Norte, que incluye los Departamentos de Alta y Baja Verapaz, Quiché, Huehuetenango y una pequeña parte de Izabal; y la zona de la Costa Sur y Occidente, que comprende los Departamentos de Escuintla, Retalhuleu, Suchitepéquez, Chimaltenango, Sololá, Quetzaltenango y San Marcos (4,8).

Guatemala es uno de los pocos países que cuenta con las condiciones ecológicas que el cultivo requiere, por lo tanto, sus plantaciones siguen incrementándose en respuesta a la rentabilidad del cultivo. Algo que posee el cultivo del cardamomo en ventaja sobre cultivos tradicionales como el café y caña de azúcar, es que no tiene convenios internacionales, hasta el momento, que regulen las exportaciones y los precios de las mismas.

La mayor parte del área cultivada con cardamomo tiene rendimientos menores de doscientos kilogramos por hectárea debido a labores carentes de técnica, mientras que las plantaciones con alto grado de tecnifica-

ción, pueden llegar a producciones que sobrepasen los 700 kilogramos pergamino por hectárea (28).

En la actualidad, el cardamomo en Guatemala es atacado por una enfermedad conocida como "Virus del mosaico del cardamomo" (VMCar), el cual fue detectado por primera vez en la finca La Florida, Quetzaltenango, en el año de 1975 (25). En el año de 1983, Menéndez (42), detectó un brote de infección en la zona norte, específicamente, en un extenso valle llamado Ticarío, Chisec, Alta Verapaz.

Los daños producidos por el virus no han sido evaluados en forma técnico-científico, pero se estima que la enfermedad afecta hasta un 70 por ciento de la producción actual (8).

De no tomar medidas o estrategias de control adecuadas contra el virus, podría terminar de manera definitiva con este cultivo en el país. Afortunadamente, eliminando plantas infectadas, huéspedes alternos y controlando los vectores, más siembra de plantas libres de VMCar, se puede evitar parcialmente lo mencionado con anterioridad (2,8,10,30,42,44).

Desde el punto de vista socio-económico, el cardamomo es fuente de ingresos para un gran número de familias del área rural. El cardamomo requiere aproximadamente de 221 jornales de mano de obra por manzana al año, siendo sustancialmente mayores que los del algodón, 44 jornales al año, café 86 jornales, caña de azúcar 83 jornales y otros.

Una característica importante de este cultivo, es que por tener una fructificación constante a lo largo del año, requiere que se efectúen cortes periódicos, dando así una ocupación de mano de obra en forma permanente (28).

En lo que al país refiere, el cardamomo, es fuente de divisas de vital importancia, sobre todo en estos difíciles años de recesión económica como el que estamos viviendo en 1985.

El uso del cardamomo en la industria de alimentos, es para la confección de pastas para pasteles y galletas finas; en condimentación de alimentos, elaboración de embutidos, salsas y preservación de carnes. En el Medio Oriente, se usa mezclado con café (28,51).

El aceite de cardamomo se utiliza en la industria de perfumes, cosméticos, licores y otras bebidas; para aromatizar cigarrillos y la industria farmacéutica lo usa en la fabricación de medicamentos estimulantes de las funciones gastrointestinales (28,51).

El destino de las exportaciones es al Medio Oriente, el principal mercado; así como también Alemania, Suecia, Finlandia y Estados Unidos de Norte América (28,51).

La investigación sobre la posibilidad de que la peligrosa enfermedad del VMCar pudiera ser transmitida por vía mecánica, constituyó el objetivo de la presente investigación, de modo que pudieran visualizarse métodos de defensa de la plantación para impedir o reducir,

en lo posible, la transmisión de esta enfermedad por medios mecánicos. Trabajo que se encuentra incluido en el Programa creado por la Asociación de Productores de Cardamomo y la Universidad del Valle de Guatemala (APROCAR-UVG), con la colaboración del Dr. Dennis Gonsalves de la Universidad de Cornell, Estados Unidos de Norte América.

En consecuencia, nuestro interés al investigar la transmisión mecánica del VMCar, es saber cuál de las formas (la acción del viento, la acción mecánica por insectos, animales o por el hombre al romper tallos y hojas y exponer los tejidos a la inoculación de alguna enfermedad) tiene mayor incidencia en el campo para que la lucha contra la transmisión de esta enfermedad se concentre más en estas formas.

Al analizar los objetivos del trabajo, se pensó primero en:

1. Determinar las condiciones para la transmisión mecánica del VMCar.
2. Luego se planteó la pregunta: si este tipo de transmisión de la enfermedad fuera factible y se averigua si es posible la transmisión de la enfermedad vía mecánica.
3. Al comprobar lo anterior, se delinearán métodos que tiendan a disminuir o eliminar esta forma de transmisión en el campo.

Estos son los objetivos, quedando claro que todos los esfuerzos que se hacen, son para mantener una plantación sana y con buena producción.

La hipótesis planteada es que la enfermedad del VMCar se transmite por medios mecánicos.

## II. REVISION DE LITERATURA

### A. El Cultivo del Cardamomo

El cardamomo es un fruto triangular y correoso, cuyas semillas se emplean en medicina como carminativas y aromáticas. Es una planta herbácea perenne. Elettaria cardamomum Maton, pertenece a la familia zingiberaceae. Planta arbustiva, propia de las regiones montañosas y húmedas de la India, Ceilán e Indochina. Por el año 1800, todo el producto provenía de estas regiones, el cultivo era sólo aclarar parcialmente el bosque alrededor de las plantas (16,18,35,48,66).

#### 1. Características Botánicas

Se dividen de la siguiente forma:

##### a) Estructura

Planta herbácea vivaz, de rizoma subterráneo rastrero, del cual se originan varios brotes aéreos erectos con panículas erectas o postradas. Su rizoma, algo leñoso, en forma horizontal, con numerosas raíces fibrosas superficiales; con brotes en número de 10 a 20 con 3 a 5 m de altura, están compuestos de hojas con largas vainas abiertas longitudinalmente, nacidas en forma de macollas o arbustos. Las hojas con dos láminas, lanceoladas, terminadas en punta, de 30 a 70 cms de largo y de 5 a 15 cms de ancho, de color verde intenso, lisas en el haz y verde claro en el envés. El envés puede ser tanto liso como pubescente, ésto depende de la variedad y raza (10,51,55,65,66).

El tallo floral se origina en la base de los brotes con una longitud de 60 a 150 cms; estas son inflorescencias que tienden a ser erectas, inclinadas u horizontales y alargadas. Posee brácteas algo largas con enrollamiento axilar, frecuentemente con dos o tres flores. Estas flores son hermafroditas, sigomórficas con alrededor de 4 cms de largo y 1.7 cms de diámetro. Su bracteola es tubular como el cáliz, con color verde, poco tridentado y firme. El tubo de la corola es de un mismo largo, casi igual al del cáliz, posee tres lóbulos estrechos, frondosos con coloración verde tenue. Cuenta con un labelo formado por tres estambres modificados, con un largo de aproximadamente 1.8 cms de largo con terminación ondulada; en sí la flor es pequeña, alrededor de 4 cms de largo y son similares a las del gengibre, de color blanco o verde pálido, con el labio central violeta. Cuenta con un estambre funcional y una larga antera (33,51,65,66).

El fruto, es una cápsula ovoide verde o amarilla, de 1.3 a 2 cms dependiendo de la variedad. Contiene 15 a 20 semillas duras de un color pardo negruzco, las cuales se caracterizan por un poderoso y aromático olor y sabor (51,66).

#### b) Citología

El número cromosómico básico de Elletaria, según Darlington y Wylie, es de  $X = 12$  y de acuerdo con Gregory, el número somático es de  $2N = 48$ ; sin embargo, Chakravorti indica como  $2N = 52$  (66).

c) Polinización

El cardamomo posee flores auto-estériles, por lo que es necesario sembrar una mezcla de clones para que la polinización sea posible. Se lleva a cabo en forma natural una polinización cruzada, por medio de abejas y otros insectos (8,42).

d) Sistemática

Según Wyllis (45), el género Elettaria posee siete especies en Indo-Malasia. El Elettaria cardamomum Maton, es el cardamomo cultivado. Existe cierta confusión en lo que se refiere a la sistemática, razas, etc., de Elettaria cardamomum y ésto se debe a que son interfértiles las variedades y razas. En base al tamaño del fruto, han sido reconocidas botánicamente dos variedades (66).

d.1) Variedad Major Thwaiter

Es el cardamomo silvestre de Sri Lanka, el cual se cultiva ocasionalmente. La planta es robusta, alcanza alturas de hasta 3 metros, sus pseudotallos son rosados, hojas amplias e inflorescencias verticales. Su fruto es alargado, de 2 a 5 cms de largo con coloración verde amarillento, posee mayor número de semillas, pero poco aromáticos.

d.2) Variedad Cardamomum (sin. var. minor Watt; var. minúscula Burkill)

Aquí se incluyen la mayoría de las razas cultivadas. La altura varía de 2 a 5 metros. La inflorescencia es larga con mayor nú-

mero de flores, puede ser horizontal, arqueada o vertical. Los frutos son menos grandes, menor cantidad de semillas y tamaño, pero más aromáticas que la otra variedad.

Las más importantes variedades reconocidas son:

d.2.1 Cardamomo de Malabar

Con una altura no mayor de los 2.8 m, con tallos cortos, hojas no mayores de 50 cm de largo, pubescentes en el envés, inflorescencias de hasta 1 m de largo, postradas, con frutos pequeños redondos, levemente curvos. Se cultiva principalmente en la India, en los Estados de Coorg y Mysoure. Es muy susceptible al Virus del mosaico del cardamomo (51,66).

d.2.2 Cardamomo de Mysoure

Son plantas con tallos de hasta 5 metros de altura, con hojas largas y gruesas, lisas en el envés. Los tallos florales son erectos o ligeramente arqueados, con frutos más largos. La mayor parte de cultivadores, en Madras y en Travancore-Cochin, en la India, prefieren este tipo Mysoure; pues se daña menos por ser de tipo de florescencia erecta. Posee cierta resistencia al Virus del mosaico del cardamomo (51,66).

En Guatemala se acostumbra dar diferentes nombres a las líneas que se producen, tales como: cardamomo blanco, amarillo, pache, etc. Se cree que todos se derivan de las variedades cardamomum y major Thwaites. En las montañas de Alta Verapaz se ha reportado la existencia de plantas silvestres de cardamomo (28).

## 2. Ecología del Cultivo

El cardamomo es un cultivo estrictamente tropical que requiere de un clima moderadamente cálido, con una temperatura media anual de alrededor de 22°C (72°F) y 2,500 mm de lluvia anual (51). Se requiere una altitud de 750 a 1,500 m sobre el nivel del mar, (65) pero con mejores resultados entre los 900 a 1,300 m (4,51).

El cardamomo es muy sensible a vientos fuertes. Otro factor importante es la sombra, la cual sirve como medio de protección para los vientos como también para la luz directa del sol. Una sombra suave entre 30 a 40% se considera adecuada (47).

En la Costa Sur de Guatemala se ha cultivado el cardamomo al sol, obteniéndose producciones mayores por área a los bajo sombra. Es aconsejable los suelos con una textura franco-arenosa, también se recomienda que los suelos tengan una buena proporción de humus (51). La planta de cardamomo requiere de un excelente drenaje (4,66).

## 3. Importancia Económica

El principal uso actual del cardamomo es en el arte culinario, casi en su totalidad, el mercado internacional lo absorben los países árabes del Medio Oriente y Escandinavia.

El cardamomo, ha sido utilizado tradicionalmente para aromatizar y darle un poderoso sabor a especie al café.

El cuadro No. 1 fue sacado de datos estadísticos de la Embajada de los Estados Unidos de América, referente a productos nacionales exportados hacia dicho país.

Se presenta por tener un renglón de cardamomo, el cuál muestra una baja de 36% entre la exportación de 1979 y 1983. Los valores indicados son en miles de dólares americanos.

All items in U.S. imports for consumption from Guatemala, 1979, 1980, 1981, 1982, and 1983--Continued

(In thousands of dollars; customs value)

USDA Number	Description	1979	1980	1981	1982	1983
16010	Coffee, crude, roasted or ground	253,960	196,111	104,833	141,501	144,562
16020	Coffee, soluble or instant, nonfat	1,669	1,003	1,370	2	123
16050	Tea	0	0	0	0	18
16111	Cardamom	712	616	326	551	448
16119	Ground cinnamon	0	0	0	0	1/
16135	Unground ginger root	0	6	2	4	1/
16179	Ground black or white pepper	0	0	0	0	1/
16183	Other capsicum pepper	0	0	1/	0	0
16186	Pimento, unground	64	184	229	36	31
16215	Mixed spices	5	35	49	76	1
16546	Pineapple juice, not mixed, concentrated	0	0	0	1	1
16555	Fruit juices, nes, not mixed, concentrated	0	0	0	4	5
16705	Ale	0	0	0	22	29
16710	Champagne and other sparkling wine	0	0	0	0	2
16944	Spirits nes, not over 1 gallon	0	0	0	0	2
17032	Filler tobacco leaf, not stemmed	150	111	431	160	128
17035	Cigarette leaf, not mixed or ground	0	0	0	0	1,379
17050	Tobacco stems, not cut, ground	157	95	112	0	4
17060	Strap tobacco	5,930	1,125	719	604	29
17080	Tobacco, manufactured or not manufactured	0	2,582	7,868	4,778	12,594
17545	Sesame seed	5,923	4,902	5,715	6,368	6,935
17557	Oil bearing nuts and seeds, nes	1/	2	1	1	1
18220	Biscuits	0	0	21	31	27
18230	Cereal breakfast foods and similitudines	6	16	30	120	185
18232	Chewing gum	151	123	83	19	28
18236	Macaroni, noodles, vermicelli, etc.	5	12	18	0	1
18246	Sauces, except thin soy sauce	187	0	0	0	366
18252	Soups, not oyster	20	33	61	96	58
18305	Edible preparations not specified elsewhere	0	1/	58	10	7
18834	Chicle, refined, advanced	0	0	0	0	0
18838	Gums, gum resins and resins, nes	0	0	0	241	616
19218	Fresh cut roses; bouquets, wreaths	0	76	326	392	609
19221	Fresh cut flowers; bouquets, wreaths	0	193	235	272	144
19225	Hops	0	0	0	6	1
19320	Wafers, not edible	1/	0	0	0	14
19325	Vegetable substances, crude, nes	1,734	1,754	2,336	1,903	1,260
20035	Logs and timber, rough, split, etc.	0	76	128	6	7
20040	Wood sticks (except bamboo and rattan)	8	0	0	0	1
20091	Softwood dowel rods and pins	13	25	0	0	12
						66

Recientemente, es utilizado como saborizante que le agrega un sabor exótico a horneados en pastelería, como en panadería. En otros países de Europa y Norte América, es utilizado como condimento en la elaboración de ciertas salsas, sopas, etc. y en la aromatización de algunos tabacos para mezclas (19,41,53).

En Guatemala se produce en pequeñas cantidades aceite de cardamomo el que se utiliza para agregar sabor a ciertos licores, en la elaboración de medicinas y en perfumería (19,48,51).

Para Guatemala, desde 1959, las exportaciones principiaron a tener importancia. En 1978 más de dos mil toneladas métricas fueron exportadas, proporcionando un ingreso de 30.8 millones de Quetzales. Siendo así, como se colocó en el tercer lugar entre los productos de exportación, después del café y el algodón (28).

En 1982 la producción fue de 6,259.1 toneladas métricas obteniéndose 44.2 millones de Quetzales por concepto de exportación (24).

En el período de agosto de 1983 a junio de 1984, Guatemala obtuvo por concepto de ventas de cardamomo 62.6 millones de dólares americanos (23).

El cultivo del cardamomo necesita aproximadamente un total de 221 jornales por hectárea en un año, lo que significa por estimaciones del año 1978, que se dió ocupación a 14.7 miles de personas (28).

En Guatemala el cardamomo se utiliza para elaboración de dulces, goma de mascar, enjuagues bucales, en polvo para mezclarlo con el café.

En la India, los dulces de cardamomo son muy populares y se llaman Boli y Laduu (41,52).

#### B. La Enfermedad del Mosaico del Cardamomo

El VMCar fue detectado en Guatemala en 1975, en el Municipio de El Palmar, Quetzaltenango. Posteriores reconocimientos demostraron su presencia en toda la franja cardamomera de la Costa Sur. Hasta el año 1980 no se había encontrado su presencia en la Zona Norte del país (25).

Estudios recientes han comprobado la existencia de focos de infección en diversas áreas del Norte de Guatemala (42).

El VMCar se manifiesta en las hojas de la planta, a veces en el tallo. Las hojas pierden gradualmente el color verde y se tornan cloróticas, con manchas intravenales. La enfermedad se esparce de la región apical a la inferior de la planta. Al ser infectadas las plantas a temprana edad, presentan achaparramiento y no alcanzan un desarrollo normal. Las plantas adultas afectadas se marchitan gradualmente y se tornan raquílicas. Al avanzar la enfermedad, aumenta el número de hojas caídas y tallos marchitos, siendo este proceso irreversible ya que no se sabe de ninguna planta que se hubiese recuperado (8).

Una plantación infectada tiene una baja cosecha, tanto más conforme lo avanzado de la enfermedad. Las plantas enfermas con VMCar, tienen un promedio de vida de 4 años, después del cual perecen (22,53).

El agente causal de la enfermedad es un virus de varilla flexible (22). Este ha sido reportado como no-persistente (61) y como semi-persistente (62) en el áfido Pentalonia nigronervosa que se tiene como el principal vector de la enfermedad en forma natural (11). La transmisión por medio de semilla no es factible (1), también se ha intentado probar la transmisión por la savia y ha sido negativo (22, 29, 35, 42, 45).

### C. Técnicas Serológicas

La serología se dedica principalmente al estudio de los componentes de tipo antígeno y anticuerpo del suero, con el fin de diagnosticar la existencia de anticuerpos específicos frente a un determinado germen y conocer si se padeció o padece la enfermedad.

La serología se basa en las reacciones inmunológicas, las cuales tienen una base común. El agente inmunizador, llamado antígeno o inmunógeno que estimula al animal a desarrollar proteínas llamadas anticuerpos en su suero sanguíneo, las cuales reaccionan específicamente con el antígeno que estimuló su producción.

Por fortuna 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 inmunógenos. Sin embargo, la reacción entre un anticuerpo y el antígeno puede ser fácilmente estudiada in vitro (8, 22, 26).

Hay varias formas con las cuales se puede demostrar la reacción entre partículas de virus y sus anticuerpos. La mayoría de métodos se llevan a cabo in vitro y varios pueden ser usados cuantitativamente y cualitativamente para determinar las concentraciones de antígeno y anticuerpo, pero éstos difieren en conveniencia y sensibilidad. Algunos de éstos son los siguientes:

1. Prueba de precipitación de tubo;
2. Aglutinación de cloroplastos;
3. Prueba de precipitación cuantitativa en porta objetos;
4. Prueba de fijación-complemento;
5. Prueba de precipitación de anillo de interfases;
6. Prueba de difusión en gel;
7. Prueba de inmuno-osmofóresis;
8. Técnica de anticuerpos traza;
9. Técnica inmunosorbente enzima conjugada (ELISA) (26).

La última prueba, inciso 9, fue la utilizada en el presente trabajo.

#### D. La Técnica inmunosorbente enzima conjugada (ELISA)

En 1977 se adoptó la técnica inmunosorbente enzima conjugada (Enzymelinked immunosorbent assay) para la detección de virus en plantas por Voller, et al (63) y Clarck & Adams (13).

##### 1. Fundamentos de la Técnica ELISA

En este método, el virus de la muestra probada es selectivamente atrapado e inmovilizado por un anticuerpo específico y absorbido a una

superficie sólida. El virus atrapado reacciona con la ayuda de un anticuerpo específico, al cual se le ha enlazado una enzima. En seguida de lavar, la enzima que ha formado un complejo con el virus atrapado, es detectado colorimétricamente por la adición de un substrato adecuado a la enzima (13) y el cual por hidrólisis, da una coloración amarilla (3).

## 2. Condiciones de la Técnica ELISA

Varias técnicas serológicas no pueden ser utilizadas debido a las limitaciones, tales como: bajas concentraciones del virus, costo de reactivos, equipo sofisticado, otros. Todo lo anterior es superado por ELISA (13). Ventajas particulares de la Técnica ELISA sobre otras de anticuerpo-enlazado, son la combinación en la economía de reactivos, la alta sensibilidad y su potencial de medición. Es sumamente versátil detectando virus isométricos y filamentosos en preparaciones purificadas como en extractos crudos del hospedero (13).

La técnica enzima inmovilizada, ha sido reportada como más sensible, en comparación con las técnicas de radio-inmovilizadas (3, 8).

La eficiencia de la técnica ELISA es independiente de la relación antígeno-anticuerpo.

## 3. Tipos o clases de ELISA

La técnica de enzima inmovilizada ha tenido algunas modificaciones, las que han originado diversos tipos, que varían en algunas de sus características de detección serológica. Estos son:

a) Método directo o de doble Sandwich

El tipo más conocido y del cual existe información detallada, es el método de doble sandwich (43, 54).

Esta técnica consiste en la adhesión de la gama-globulina anti-virus específica a la placa de poliestireno por medio de un "buffer" de carbonato de sodio a p H 9.6. Seguidamente se colocan las muestras del material a investigar, de forma que si el virus está presente, puede ser atrapado por los anticuerpos y fijados a éstos por una reacción antígeno-anticuerpo. Luego se adiciona gama-globulina conjugada a una enzima, para completar el doble sandwich. Finalmente, se adiciona el substrato de tal suerte que si es virus está presente durante el proceso, una reacción amarilla (13).

Este método tiene la desventaja de que requiere conjugar la enzima a cada antisuero purificado.

Esta prueba tiene una especificidad tan alta, lo que la hace capaz de diferenciar líneas muy relacionadas serológicamente del mismo virus (17).

b) Método indirecto

Se ha empleado poco por ser un método nuevo. A grandes rasgos, consiste en la adhesión de las muestras del material en estudio a la placa de poliestireno por un "buffer" de carbonato de sodio. Si en la muestra existe virus, éste se adhiere a la pared de los pocillos de las placas de poliestireno. Después se coloca la gama-globulina anti-

virus de conejo, preadsorbida, de manera que se enlace a las partículas del virus. Seguidamente se adiciona una gama-globulina anticonejo conjugada a una enzima, de suerte que se enlace a los anti-virus. Finalmente, se adiciona el substrato, de forma que si se ha dado origen al complejo virus-antivirus-anticonejo se obtenga una reacción positiva (27).

Tiene esta prueba 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 (15).

#### 4. Análisis de las muestras

La decisión respecto a considerar una muestra infectada es difícil y dudosa en algunos casos, ya que el punto a partir del cual debe tomarse en cuenta la reacción como positiva, visualmente, es muy subjetiva. Por lo tanto, la evaluación de positividad hace necesario el uso del análisis fotométrico. Clark(9) 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 superiores 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 sa-

nos más dos desviaciones estandard (14). Según Diez (21) toma tres desviaciones estandard en adición a la media aritmética de los controles sanos para la determinación del umbral de infección en plantas de cardamomo.

## E. Transmisión de Virus

### 1. Por vectores

Los áfidos constituyen el mayor grupo conocido de vectores de virus en plantas y más de 100 virus son reportados como transmitidos por ellos. Ellos son importantes económicamente, porque dañan directamente las cosechas y además como propagadores de virus de plantas enfermas a plantas sanas. Pérdidas de cosechas ocurren cuando enormes poblaciones se alimentan y se desarrollan rápidamente, pero aún pueden ocurrir pérdidas mayores cuando el virus es diseminado en áreas de cultivo más grandes (37, 38, 64).

Los áfidos tienen una vida compleja en la cual se involucra una generación asexual alternada con una generación sexual. Ellos tienen diferentes formas, cada una adaptada a una función vital particular (polimorfismo). Plantas en las cuales la forma sexual de los áfidos colocan sus huevos son llamadas: hospederos primarios; mientras los hospederos secundarios son aquellos donde la generación asexual se reproduce con gran eficiencia por partenogénesis y los recién nacidos son vivíparos (vivos y activos). Los hospederos secundarios son a menudo cultivos agrícolas (37, 64).

Después de la migración, los áfidos principian a probar plantas insertando las puntas de sus estiletes en un área apropiada de la epidermis del hospedero y seguirá su búsqueda hasta su planta preferida. Los áfidos entonces: (1) puede tornarse descontentos con la planta y dejarla; (2) pueden satisfacerse y permanecer acaso por el resto de sus vidas; o (3) pueden satisfacerse, reproducirse y dejarla después de unas cuantas horas.

Estos tres patrones de comportamiento son reflejados en tres distintos tipos de transmisión de virus:

- a. Virus transmitidos por áfidos que adquieren y transmiten en espacio de pocos minutos y son rápidamente eliminados de los vectores, se les llama usualmente: no persistentes.
- b. Afidos que se mueven frecuentemente mientras colonizan un cultivo, transmiten virus semi-persistentes después de alimentarse como mínimo por 15 minutos y estos virus pueden ser transmitidos con éxito hasta dos días después en las plantas.
- c. Afidos más sedentarios a menudo transmiten virus persistentes, los cuales requieren muchas horas para ser adquiridos y más aún para ser inoculados en las plantas; vectores pueden retener estos virus por toda la vida (37, 64).

Aparte de los áfidos (orden Homóptera; Fam. Aphididae) como vectores, existen otras familias de insectos que pertenecen al mismo orden y estos son: Cicadéllidae, Fulgōridae.

Hay otros ordenes como el Orthóptera al cual pertenecen los grillos, de los cuales algunas especies son conocidos transmisores de virus.

Del orden Coleóptera hay varias familias de escarabajos que son vectores de bacterias.

Del orden Díptera hay varias familias de moscas que son vectores de varios tipos de enfermedades, también abejas que pertenecen al orden Hymenóptera (9, 38).

## 2. Por Tutores

Según Bennett, cúscuta es una planta reportada como transmisora de virus y ha sido utilizada extensivamente en la investigación de virus. Tiene un valor especial en la transmisión de virus no transmisibles por savia y para los cuales tampoco se conocen insectos vectores (6).

La cúscuta es una planta phanerogama parasítica carente de clorofila y hojas de género cúscuta de la Convolvulaceae. La cúscuta parasita un amplio rango de plantas y puede transportar virus a través de sus enredaderas (6).

Con virus de plantas leñosas, la única forma de demostrar el caracter infeccioso de la enfermedad, es por medio de cúscuta. Fulton ha reportado la inoculación exitosa de virus por varias especies de cúscuta. Las especies más comunmente usadas han sido C. subinclusa y C. campestris (2).

Las semillas de cúscuta pueden permanecer viables hasta por diez años, y germinan mejor cuando son colocadas en la superficie de la tierra entre plantillas de una planta hospedera. Las plantas de cúscuta deben de establecerse en un hospedero libre de virus como fuente, para poder sacar de ellas retoños. Las plantillas o retoños de cúscuta se colocan en las partes axilares de la planta a probar y cuando ella está bien establecida en la planta sospechosa, los retoños son desprendidos hacia la planta indicadora y se les permite se establezcan en ella (26).

Hay evidencia que la transmisión de virus es más probable que suceda cuando la planta receptora es colocada en la obscuridad, causándole una deficiencia alimenticia (38).

La cúscuta también es útil en separar un virus de otro cuando ambos están infectando la misma planta hospedera (31).

El uso de cúscuta tiene ciertas desventajas. Primero, la cúscuta por sí misma, es un hospedero natural de diversos virus de plantas que pueden ser infectadas por un virus latente que no produce síntomas obvios. Segundo, este método de transmisión toma mucho tiempo por ser un método exploratorio en la transmisión experimental; y por último, varias especies de cúscuta son requeridas durante la investigación inicial, puesto que los virus pueden ser transmitidos solamente por una especie específica de cúscuta.

Se debe tomar la precaución de que la cúscuta que se utilice en experimentación, debe provenir de semillas; puesto que el virus latente del mosaico de cúscuta, es el único virus conocido que puede ser transmitido a través de sus semillas y, principiando, la cúscuta de semillas se eliminan otros virus comunes que infectan a la cúscuta como el virus del mosaico del pepino (7).

### 3. Por Injerto

Injertación es una práctica hortícola antigua en la cual las superficies cortadas de tejido de diferentes plantas, se llevan a un contacto íntimo en el cual se establece una unión. Usualmente, la injertación se lleva a cabo por el transplante de una parte distal de una planta (el vástago) a la porción de otros (el patrón). Cuando cualquiera de los dos, el vástago o el patrón, es infectado; el virus usualmente invade al compañero sano y causa síntomas visibles.

Los primeros reportes de lo que ahora conocemos, que fueron las primeras transmisiones de virus por injertos, datan del siglo XVII, cuando productores holandeses de tulipanes, descubrieron la habilidad de producir el tan apreciado imperfecto color de las flores, podía ser pasado de un tulipan a otro, por la injertación de bulbos, simultáneamente (26).

Los virus son también inconscientemente y eficazmente transmitidos por horticultores al momento de la multiplicación por medio de la propagación vegetativa de plantas por injertación. Estas prácticas son responsables

de la amplia difusión y frecuente ocurrencia de virus en plantas leñosas, como manzana, pera, cerezo, ciruela, vid y cítricos.

Los virus son transmitidos por injerto más eficientemente, cuando el patrón y el vástago casan perfectamente, lo cual sucede únicamente cuando el cambium está en contacto y sus tejidos son compatibles.

Por ejemplo, especies distantes taxonomicamente, son, en su mayor parte incompatibles y las monocotiledoneas no pueden ser injertadas en la forma usual. Con plantas herbáceas en particular, la superficie injertada debe de mantenerse húmeda y la pérdida de agua minimizada por medio de la remoción de hojas innecesarias del vástago y mantener a la planta en condiciones de buena humedad (26).

La parte del injerto, la cual es la receptora (el patrón), se aconseja que sea colocado en una parte oscura, lo cual dirige el flujo de asimilación y virus hacia esa parte. El resultado alentador de nuevos crecimientos acelerarán también la expresión de síntomas (38).

La transmisión por injertos tiene sus limitaciones inherentes. Primero, si más de un virus está infectando el hospedero donante, el receptor, en pocas excepciones recibirá ambos virus a través de la unión formada por el injerto. Segundo, se requiere de varias semanas para que se establezca el injerto y luego se puede dar un atraso mayor en la aparición de síntomas. Tercero, el método se encuentra limitado a la compatibilidad del vástago y del patrón, y en la mayoría

de los casos son posibles interespecífica e intergenéricamente los injertos. Los injertos entre distintas familias de plantas son menos comunes (32). Fig. 1.

#### 4. Por semillas

En la transmisión de enfermedades por semilla, el hombre es a menudo un importante agente, contribuye a la perpetuación y diseminación de la enfermedad a través del descuido o ignorancia durante la propagación o el cultivo de especies de plantas provechosas.

La transmisión por semilla aparentemente depende de la combinación de virus-semilla más que cualquier otro factor. El éxito y alcance de la transmisión es, en algunas situaciones, determinado por la fuerza particular del virus o la variedad de la semilla. La intensidad de la transmisión también se ve influenciada por otros factores, tales como: la edad o etapa en la cual se ve infectada la semilla, la temperatura durante y después de la infección, la madurez de la semilla y talvez a otros factores que no están claros o aparentes.

La extensión de la transmisión por semilla varía con la combinación particular de virus-semilla, fluctuando desde cero a 100%. La transmisión a toda la progenie es rara, aunque diversos virus han sido encontrados en una alta proporción 60-90% de la semilla. En contraste, algunos virus son probablemente inofensivos, en sus plantas hospederas (32).

La transmisión de virus por medio de semillas, no ha sido investigada exhaustivamente. Poco material se encuentra al respecto.

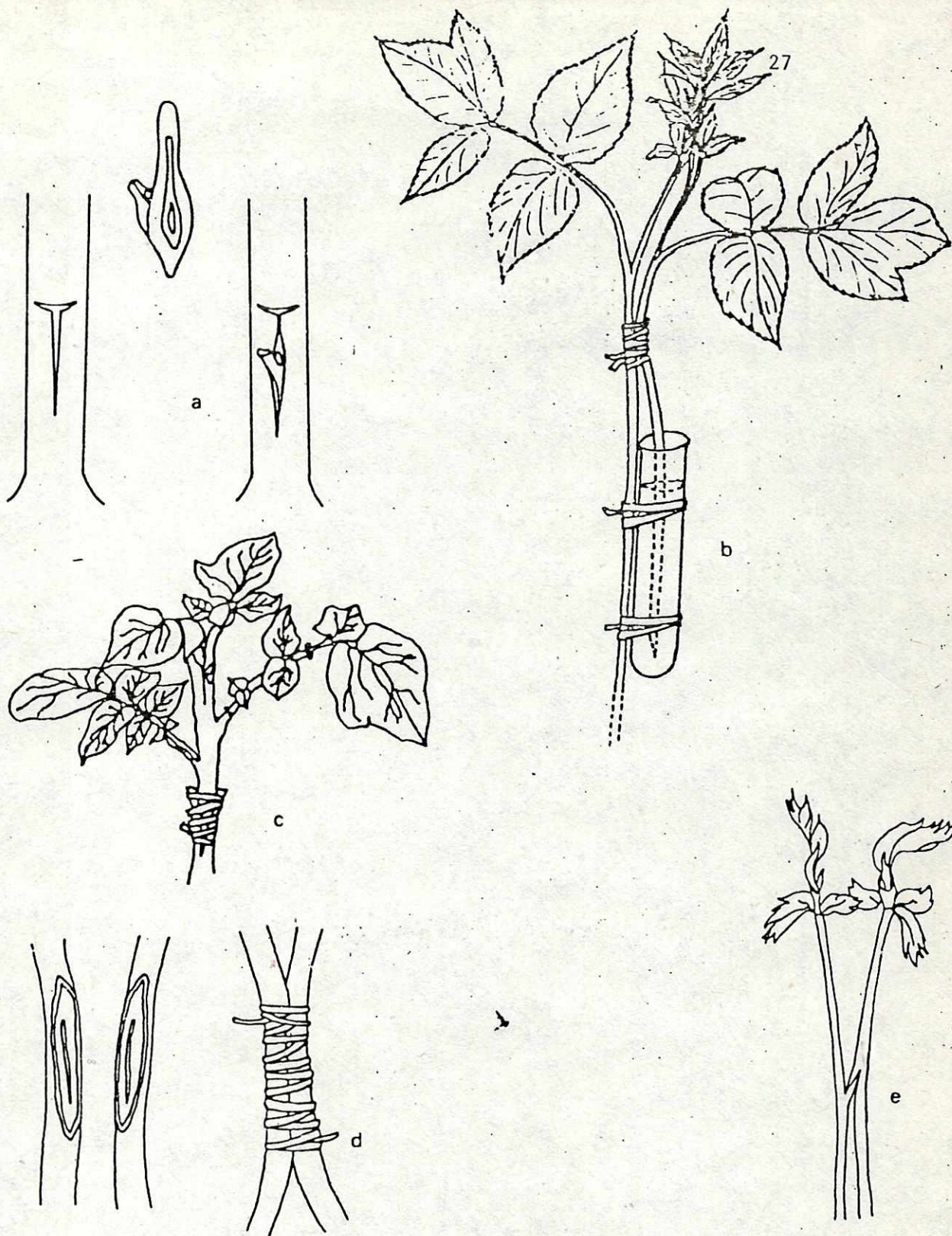


Fig. 1. Tipos de injertos más útiles usados para la transmisión de virus.

Fuente: Gibbs, A & B Harrison, Plant Virology the Principles in P.35.

Según Rao, et al (49), el virus no es transmitido a través de la semilla de cardamomo, sin embargo, semillas recolectadas de plantas infectadas dieron un porcentaje más bajo de germinación, 38.2%, comparado con 92.0% (1, 29, 35, 42).

En la transmisión de virus por medio de la cúscuta, Bennett (7) menciona que se debe de tomar precaución en la semilla de cúscuta que se quiera utilizar en experimentación. Esto se debe a que el virus latente del mosaico de cúscuta, es el único virus conocido que puede ser transmitido a través de sus semillas (32).

#### 5. Mecánica

Esencialmente, la premisa básica de la inoculación mecánica es la transferencia y deposición de virus biológicamente activo, hacia receptores dentro de células vivientes, el sitio infectable, por medio de lesión mecánica subletal. Métodos mecánicos requieren de manipulación manual para la preparación, transmisión y deposición del inóculo a sitios susceptibles en la planta hospedera. Mientras que inoculación biológica requiere de no preparación del inóculo y sólo requiere de transporte inicial de un organismo que contenga o transmita el virus (insectos, cúscuta, etc.) u organelos (pedazos de tejido, polen, etc.) hacía el sitio infectable. La inoculación mecánica difiere de la inoculación biológica en cuanto a que el proceso de inoculación se ejecuta manualmente, por el contrario de algunos agentes activos como la penetración de haustorios de cúscuta, la penetración de estiletes por áfidos o la unión de tejidos en injertos (32).

Siegel y Zaiten (56) hacen ver que en varias instancias de la inoculación mecánica, células heridas o raspadas durante la inoculación son prerequisites para el éxito en el establecimiento de infección. La secuencia de eventos principales para el éxito es como sigue: (1) extracción efectiva del virus infeccioso del tejido infectado del donante; (2) administración del virus extraído hacia los sitios infectables por medios mecánicos; (3) migración del virus administrado al receptor o receptores. La inoculación mecánica no garantiza una infección exitosa.

Partiendo de una base general, todos los métodos de inoculación en plantas con virus son ineficientes. Cada infección se cree se origina en una partícula de virus, pero el número de partículas de inóculo que debe de ser aplicado para producir la infección, es estimado de tan alto como varios millones hasta tan bajo como veinte (5). Valores intermedios van desde 50,000 hasta aproximadamente 600,000 (34).

Para alcanzar el éxito en la transmisión de virus hacia las plantas hospederas, las propiedades del inóculo de virus deben de ser consideradas previamente. Obviamente, sin un inóculo apropiado, la transmisión de virus por inoculación mecánica no tendrá éxito. Adaptabilidad del inóculo puede depender de parámetros tales como: (1) la fuente del inóculo; (2) el método utilizado en la preparación del inóculo; (3) los constituyentes en el inóculo; (4) la concentración del virus en el inóculo; y (5) la estabilidad del extracto de virus (32).

a) Fuente del inóculo

El inóculo puede obtenerse de varias partes de la planta infectada, pero hojas que exhiben síntomas son usualmente preferibles y deben de ser probadas de primero. Tejidos leñosos son por lo general, tejidos pobres. En árboles con dormancia, las regiones interiores y el cambium han sido utilizadas exitosamente. Tejido joven infectado aparentemente posee más virus infeccioso y talvez menores concentraciones de sustancias inhibidoras que en hojas maduras (32).

b) Preparación del inóculo

Esta fase es la segunda más importante que puede influenciar la efectividad del inóculo. El inóculo es preparado mediante la extracción del virus del tejido enfermo, luego de la cual el virus es expuesto a un ambiente que puede reducir la infectibilidad. Varias sustancias como metabolitos, restos celulares y compuestos aromáticos del virus modificado, son puestos en libertad simultáneamente con el virus. Algunos de estos componentes celulares cuando son liberados de la célula, poseen propiedades inhibidoras. En adición, tejido infectado debe de ser homogenizado en la presencia de un medio de extracción. En estos casos, adecuado solvente extractor debe de encontrarse para una extracción satisfactoria. En otros casos, concentraciones del virus pueden ser tan bajas que inclusive con un adecuado proceso de extracción, la cantidad de virus en el extracto es menor que el requerido para una satisfactoria inoculación mecánica (26, 32).

La efectividad del inóculo es usualmente incrementado por la liberación del virus de componentes contaminantes. Los virus pueden ser liberados de la mayoría de componentes por simples métodos de purificación los cuales incrementan la infectibilidad al eliminar inhibidores e incrementar la concentración del virus, ésto depende del virus, raza, etc. Diferentes buffers y pH se utilizan, dependiendo con que tipo de virus se trabaje al momento de extracción de éstos de tejido enfermo (32).

c) Constituyentes del inóculo

La mayoría de componentes no tienen efecto en la infectibilidad del virus y pueden ser removidos por varios métodos. Algunos de los inhibidores se han reportado que son taninos y polifenoles oxidados que aparecen durante y después del proceso de extracción del virus de tejido infectado. La remoción de cloroplastos activos a menudo incrementan la tasa de pigmentación debido a que también se remueven reductasas. Lo anterior se lleva a cabo con la adición de metales como cobre o hierro introducidos inintencionalmente como contaminantes de los aparatos usados en la extracción de virus. Por consiguiente, ambos agentes reductores y quelantes son utilizados para reducir la oxidación de polifenoles (26, 32).

d) Concentración del virus en el inóculo

La concentración del virus en extractos crudos influenciará el resultado de las pruebas de transmisión mecánica. También extractos de tejido deben de contener suficiente virus pero infección por inoculación

mecánica es impedido por sustancias que interfieren; por medio de centrifugación a altas velocidades puede cambiarse parcialmente este resultado (26, 32).

e) Estabilidad del extracto de virus

La infectibilidad por virus altamente inestable es difícil de demostrar por inoculación mecánica puesto que la infectibilidad decrece rápidamente durante y después de la extracción o se pierde de una forma desconocida. Por el otro lado, el así llamado virus inestable puede que no sea un virus, sino otro agente como mycoplasma o ácido nucleico, para transmitirla puede que sea necesario recurrir a algunas tretas.

f) Transmisión y deposición del virus

Inoculación mecánica es usualmente transportada por el frote de soluciones de virus sobre la superficie de hojas con almohadillas de gaza estéril, cepillos, espátulas de vidrio y otros implementos (67). Los cepillos parecen ser mejores instrumentos inoculadores que gazas, dedos o espátulas de vidrio. Estos consistentemente inducen a una mayor infección; sin embargo, las cerdas de los cepillos tienden a retener gran parte del inóculo (57).

La transferencia de virus dentro de las células y a los receptores es fortuito, ya que se ha infligido micro-heridas no letales de células ocurrido al azar. Tales heridas son habitualmente prerequisite a las fases iniciales de la infección (57).

El virus debe de ser capaz de penetrar dentro de las células epidérmicas a través de las ectodesmas, las cuales están justamente debajo de la cutícula y llegan a estar expuestas cuando las ceras cuticulares son raspadas. Las ectodesmas son probablemente más expuestas al virus durante la inoculación mecánica, ya que el proceso comprende escarificación de la superficie de la hoja, generalmente con la ayuda de un abrasivo como Carborundum o Celite (32, 57).

Aparte de Carborundum y Celite, existen otros abrasivos como el talco de Diatomeas, conocido comercialmente como Hyflo-Super-Cel, otro es el óxido de aluminio, con el nombre comercial de Alumina y también están los silicatos de magnesio.

En el estudio se escogió el Carborundum porque es el más duro y de mayor acción abrasiva y combinado con buffer de fosfatos más el virus, puede incrementar la posible infección de la planta.

Recientemente, Thomas y Fulton (60) concluyen que la función de las ectodesmas es de sitios infectibles y que el número o condición deben de determinar el grado de susceptibilidad del tabaco al virus del mosaico del tabaco.

Puesto que la abrasión de la superficie de las hojas por frotación es probablemente no uniforme y entonces la acción abrasiva y de heridas puede ser muy severa en algunas células e insuficiente en otras. El porcentaje del total del número de células infectadas es pequeño y el por-

centaje de células infectadas varía de una hoja a otra. Por añadidura, la susceptibilidad de una hoja varía de un área a otra, aunque todas podrían ser infectadas (32, 57).

#### 6. Por polen

La transmisión por polen ha sido experimentada y los resultados sugieren que la transmisión a través de polen, hasta formar el estado de semilla, quizás sea de poca importancia en la naturaleza, por la inhabilidad del polen infectado para competir con el polen libre de virus en la fertilización de plantas. El número de plantas infectadas es muy reducido y se da escasamente (32).

#### 7. Por Nemátodos

Se sabe de 19 especies de nemátodos que transmiten virus a plantas y todos se encuentran en los géneros Dorylaimus, Xiphinema, Longidorus y Trichodorus.

Estos géneros son bastante cosmopolita y ampliamente distribuidos a través de todo el mundo. Donde el hospedero ha sido investigado, las especies vectoras parecen ser polípagos; no obstante se deben de multiplicar con tasas variables en diferentes hospederos. Casi todas las especies, particularmente las que están comprometidas con la transmisión de virus, son probablemente parásitos obligatorios y son ectoparásitos migratorios que se alimentan mayormente en las puntas de las raíces y en menor parte se extienden a lo largo de los costados de las raíces.

Por lo menos serológicamente, nueve distintos virus son transmitidos por nemátodos; varios de ellos son transmitidos por una especie diferente de nemátodo. Todos infectan a un amplio rango de hospederos leñosos y herbáceos (58).

#### 8. Por hongos

El estudio de la transmisión por hongos de virus en plantas es importante por dos razones principales: primero, virus de plantas parece ser biológicamente el único en tener hongos como vectores y; segundo, las enfermedades que ellos causan son económicamente importantes.

Los hongos implicados en la transmisión de virus pertenecen a tres diferentes clases: Los Chytridiomicetos por ejemplo (Olpidium brassicae, O.cucurbitacearum y Synchytrium endobioticum); los Plasmodioforomicetos con los hongos Polymyxa graminis y Spongospora subterranea; y los Oomicetos con (Pythium ultimum) (59).

Los hongos como vectores producen todos zoosporas movibles. Diferencias en flagelación son consideradas de importancia taxonómica.

Con la excepción de Pythium ultimum, todos los hongos como vectores han sido satisfactoriamente cultivados en raíces de plantas. En contraste, Pythium ultimum, crece fácilmente en un medio de cultivo en el laboratorio.

Estos hongos que son vectores requieren de ciertas condiciones apro-

piadas para su cultivo, unas de las principales son: abundante humedad, necesaria para que las zoosporas nadan y penetren en las raíces de la planta. La otra es temperatura; todos los vectores son altamente activos a temperaturas, comparativamente bajas, por ejemplo, 10° a 20°C. A estas temperaturas, ellos producen zoosporas, las cuales mantienen su movilidad e infectividad por períodos mucho más largos que a temperaturas superiores, tales como 25° a 30°C (59).

#### F. Inhibición e interferencia de virus

Varios agentes ocasionan que los virus pierdan sus características y propiedades estructurales y biológicas y pueden interferir en el establecimiento y multiplicación en la planta.

Existe un amplio número de sustancias de origen natural que inhiben la infección de virus en la planta. Muchos de estos inhibidores actúan aparentemente en la planta hospedera y no en las partículas de virus.

Esta claro que un innumerable grupo de compuestos químicos pueden tener efectos profundos en el resultado de infecciones virales por una u otra de sus propiedades tóxicas o la sola presencia de cantidades en exceso. Estos compuestos incluyen agentes quimioterapéuticos, purinas halogenadas y bases de pirimidinas, ácido nucleico y aminoácidos análogos y otros específicos inhibidores sintéticos de proteínas, enzimas, o en la síntesis de ácido nucleico.

Generalmente, los inhibidores pueden ser separados o purificados de la mezcla virus-inhibidor por dilución, por sedimentación del virus, por ultracentrifugación, etc. También se ha encontrado inactivadores de virus.

La savia de hojas de muchas plantas leñosas contienen taninos, los cuales en ciertas condiciones combinados con partículas precipitables de virus, previenen la infección. La savia, generalmente, contiene poderosas enzimas oxidasa y las partículas de algunos virus son inactivadas por el producto de acción oxidasa. Este tipo de inactivación puede ser prevenido por la adición de agentes reductores (mercapto-etanol, ácido thiogeycol, hidroxiclóruo de cistina) o agentes quelantes (sodio dietilditiocarbamato) al medio de extracción (26, 32, 39, 40).

### III. MATERIALES Y METODOS

En el trabajo de investigación se ha usado el método ELISA, el cuál es explicado más adelante y para su ejecución fueron empleados los reactivos que se enumeran a continuación.

#### A. Reactivos

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

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

Este antisuero fue elaborado por el Dr. Dennis Gonsalves, partiendo de partículas del VMCar, purificados por él en la Universidad de Cornell.

2. Suero de cabra anti-conejo: específico a la gama-globulina de conejo.

En el mercado se le encuentra como sigma No. A-8025.

3. Suspensión de partes de hojas de cardamomo

Partes de la hoja son maceradas y extraídas en el buffer de acuerdo al tipo de técnica ELISA a usar. Los demás reactivos utilizados son descritos por Clarck & Adams (13) y por Gonsalves (27).

#### B. Procedimiento de la técnica de ELISA

Para simplificar la descripción de cada uno de los tipos de técni-

ca, se detallan a continuación:

1. Técnica de ELISA-directa

El procedimiento utilizado en el presente trabajo es el descrito por Clark & Adams (13).

a) Primer paso

Se usa una placa de poliestireno con noventa y seis pocillos donde se adhieren los anticuerpos en cada uno de ellos. Las placas se llenan con 0.20 ml de gama-globulina por pocillo y luego se sellan con parafilm, para impedir alguna contaminación. Seguidamente las placas se incuban en cajas de humedad de 37°C por un período de 2 a 2.5 horas. Pasado este tiempo, se lavan tres veces las placas con PBS-Tween (buffer salino de fosfatos-Tween), dejando cada una por un lapso de tres minutos antes de enjuagar. Esto con el objetivo de eliminar todos aquellos anticuerpos que no hayan sido adheridos a las paredes de los pocillos, ver Fig. 2a.

b) Segundo paso

Haciendo uso del extracto crudo de las plantas a probar, Fig. 2b, se procede a llenar 2 pocillos con cada muestra, los que pueden ser 40 por placa. Los espacios restantes se distribuyen en la placa a manera de que los controles utilizados queden estratégicamente colocados. Los controles usados, Fig. 3 son dos: un extracto de tejido sano ( $Kc^-$ ), uno de tejido enfermo ( $Kc^+$ ). Cada pocillo es llenado con 0.20 ml de la suspensión.

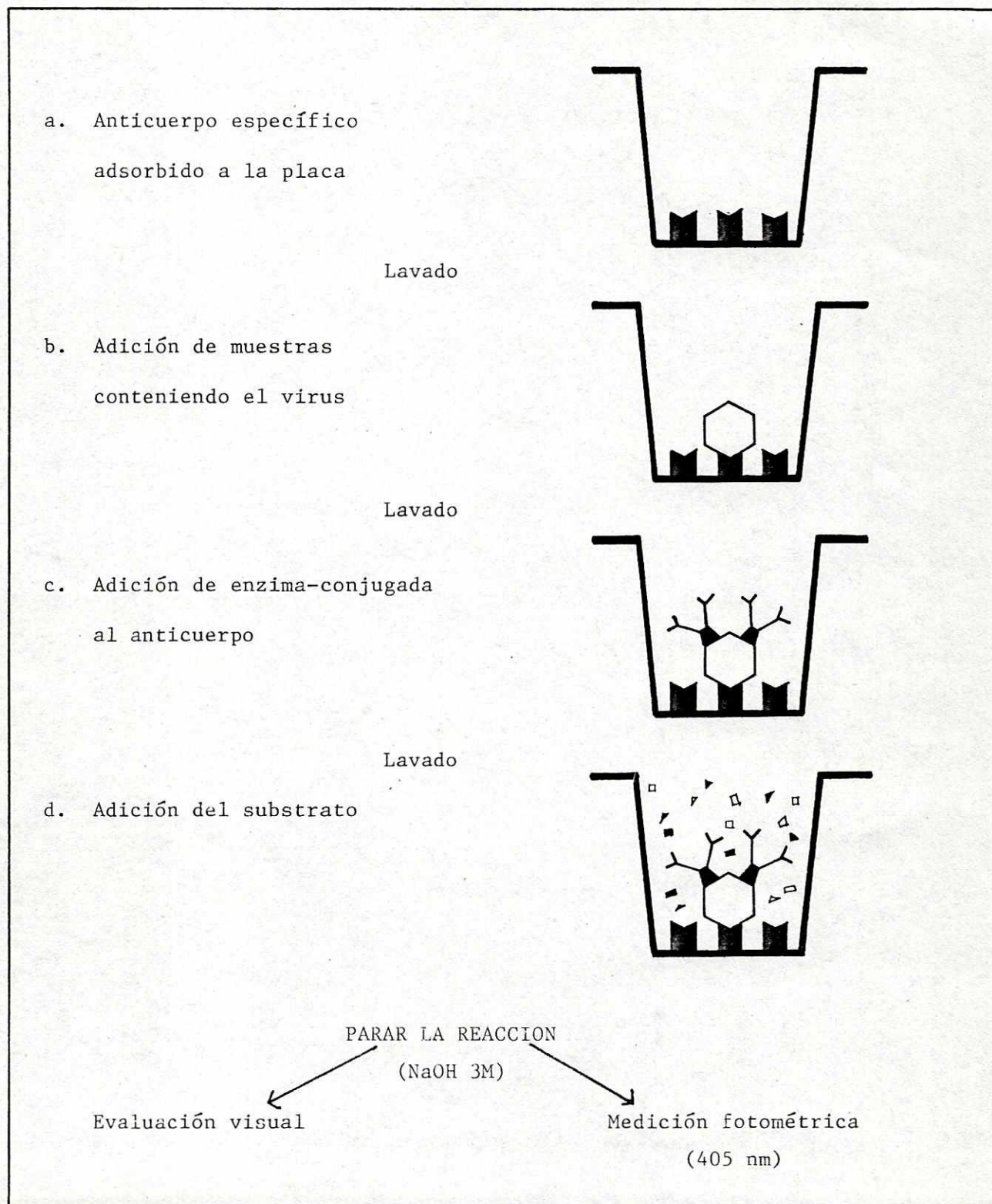


FIGURA 2

Principio de la técnica ELISA-directa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kc <sup>+</sup>	Kc <sup>-</sup>	M 1	M 2	M 3	M 4					Kc <sup>-</sup>	Kc <sup>+</sup>
B			M 5	M 6	M 7	M 8						
C	M 9		M 10	M 11	M 12	M 13					M 14	
D	M 15		M 16	M 17	M 18	M 19					M 20	
E	M 21		M 22	M 23	M 24	M 25					M 26	
F	M 27		M 28	M 29	M 30	M 31					M 32	
G	Kc <sup>-</sup>	Kc <sup>+</sup>	M 33	M 34	M 35	M 36					Kc <sup>+</sup>	Kc <sup>-</sup>
H			M 37	M 38	M 39	M 40						

FIGURA No. 3

DIAGRAMA DE DISTRIBUCION DE MUESTRAS Y CONTROLES EN LAS PLACAS DE ELISA

Luego de llenados los pocillos, se sella la placa con parafilm y se incuba en una caja de humedad en el refrigerador a 6°C, durante 8 a 12 horas. Pasado este tiempo, se procede a lavar cuatro veces con PBS-Tween, la primera enjuagando instantáneamente la placa y las restantes dejando un intervalo de tres minutos al igual forma que en el primer paso. Todo esto con el objeto de eliminar todos aquellos residuos que no estén adheridos a las paredes de los pocillos, en especial, a los anticuerpos.

c) Tercer paso

Cada pocillo vuelve a llenarse con gama-globulina enlazada con fosfatasa alcalina, Fig. 2c, usando la concentración más cercana a 1:400. Seguidamente, 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 lapso, si el virus está presente, se completó la reacción del complejo anticuerpo-virus-anticuerpo conjugado (doble sandwich). Pasado el lapso, se lava la placa con PBS-Tween, tres veces, dejando un intervalo entre lavadas de tres minutos antes de enjuagar.

d) Cuarto paso

Se usa como substrato p-nitrofenil fosfato a razón de 1 mg/ml. Se colocan 0.25 ml. de substrato por pocillo, debe de estar recién preparado, Fig. 2d. La placa se deja a temperatura ambiente, hasta que se visualice claramente la reacción en aquellos pocillos donde se lleve a cabo el 'doble sandwich' durante el proceso. Cuando se considera que

hay una respuesta apreciable al ojo, se procede a detener la reacción por medio de una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH 3M). Inmediatamente de detenida la reacción, se efectúa la lectura de la intensidad del color, mediante absorbancia a 405 nanómetros. El umbral de infección se calcula sumándole a la media aritmética de los controles negativos, tres desviaciones standard. Se saca el promedio de los controles y todas las muestras arriba del doble de este dato, son positivas.

## 2. Técnica de ELISA-indirecta

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

### a) Primer paso

Haciendo uso de una placa de poliestireno con noventa y seis pocillos, se adhieren a ellos las muestras, Fig. 3. Para ello, éstas son extraídas de una relación de 1:50. Se agregan 0.20 ml. por pocillo de las muestras a evaluar, Fig.4a. Las placas se cubren con parafilm y se colocan en cajas de humedad, las que son incubadas por 2 a 2.5 horas a una temperatura de 37°C o bien toda la noche en un refrigerador 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

Se llenan los pocillos con 0.20 ml. de la solución de gama-

\* PBS (buffer salino de fosfato)

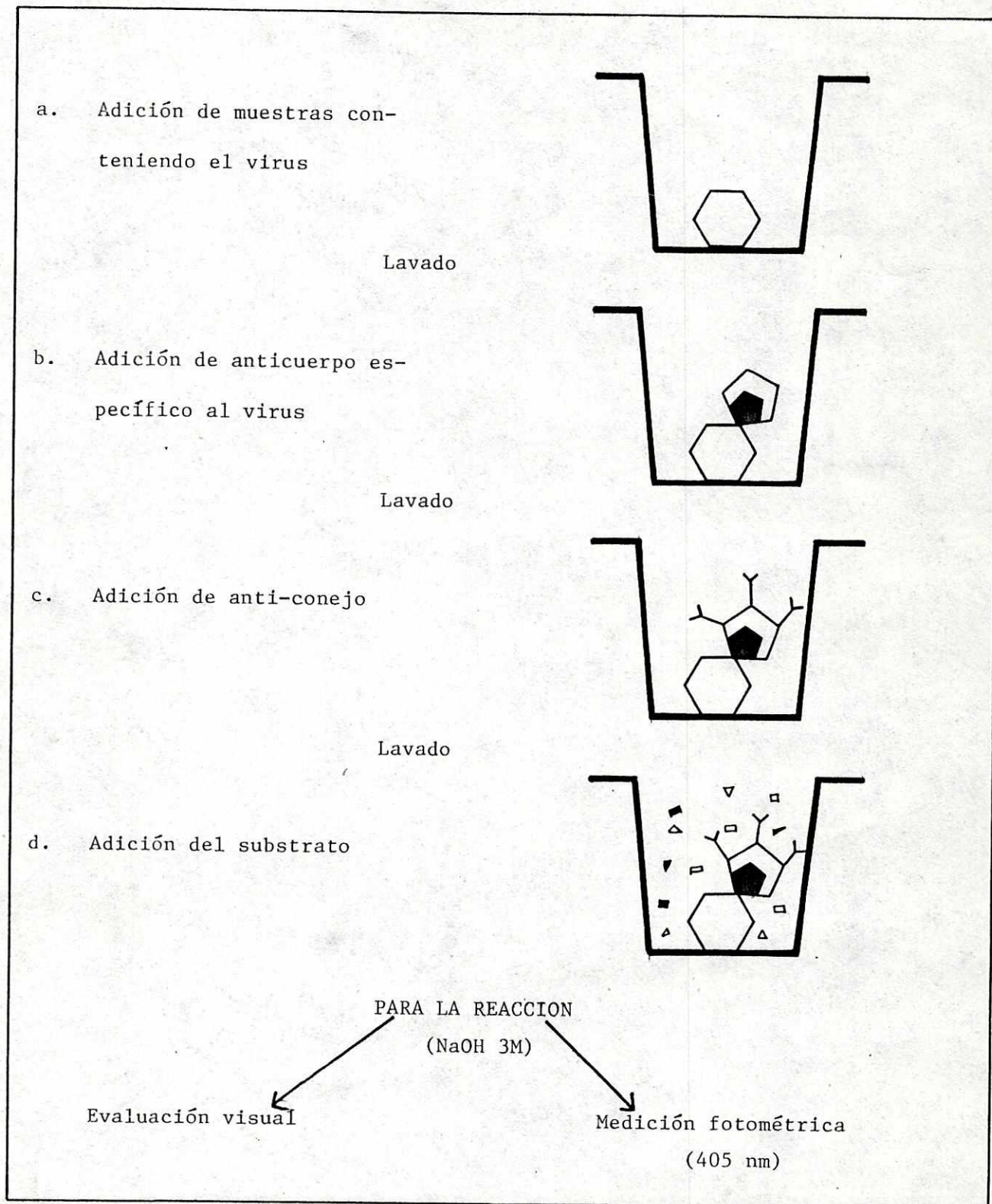


FIGURA 4

Principio de la técnica ELISA - indirecta

globulina preadsorbida, Fig. 4b. Se incuba 2 a 2.5 horas a 37°C. Pasado este lapso, se lava tres veces, a intervalos de tres minutos con PBS-Tween.

c) Tercer paso

Se prepara la enzima conjugada y se llenan los pocillos con 0.20 ml., Fig. 4c. Luego se incuba por 2 a 2.5 horas a 37°C. Después de este tiempo, se lava la placa con PBS-Tween, tres veces a intervalos de tres minutos.

d) Cuarto paso

Se adicionan 0.25 ml del substrato, p-nitrofenil fosfato. Se mantiene a temperatura ambiente hasta observar la reacción. Aquí se para la reacción agregando 0.50 ml del Hidróxido de Sodio 3M a cada pocillo. Seguidamente, se evalúa la reacción del mismo modo que se hizo con ELISA-Directa, ver Fig.4d.

C. Preparación de muestras a analizar con ELISA

La preparación de las muestras a evaluar es diferente, dependiendo del tipo de ELISA a usar. Seguidamente se detalla el proceso para cada una:

1. ELISA-directa

La solución se obtiene mediante la maceración de partes de hoja usando buffer de extracción (pH 7.4).

La maceración se lleva a cabo con un aparato denominado "tissumizer". Se usa una relación de hoja respecto al buffer de 1:25. Para impedir la contaminación del aparato, se efectúan lavados con agua destilada a velocidad alta y los residuos se retiran con un par de pinzas. Se aconseja macerar antes las muestras se suponen sanas y luego las que presentan síntomas visuales de la enfermedad.

## 2. ELISA-indirecta

La solución aquí es obtenida por la maceración de las partes de la hoja, utilizando buffer de carbonato de sodio (pH 9.6). Lo que sigue del procedimiento es lo mismo de ELISA-directa, exceptuando la relación de dilución de la parte de hoja respecto al buffer que es de 1:50.

### D. 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 Clarck & Adams (13).

A un mililitro de gama-globulina se le adicionan nueve mililitros de agua destilada. Lentamente se agregan 10 mililitros de una solución saturada de sulfato de amonio, aproximadamente, a la media hora. Se incuba durante un período de 30 a 60 minutos, a temperatura ambiente. Al transcurrir este tiempo, se centrifuga a 4,000 rpm durante 10 minutos y se colecta el precipitado, disolviendo éste en dos mililitros de 0.5 PBS. A continuación se dializa a temperatura de 4°C, tres veces,

con un lapso 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 principiar, se agita el DEAE disuelto en etanol al 28 por ciento y se mide de cinco a 10 mililitros. Luego se coloca en un beacker de vidrio. Se lava el DEAE con agua destilada, agitándolo suavemente en espiral. Se deja reposar hasta que se 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. Utilizando 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 vierte la gama-globulina con una pipeta de Pasteur, muy cuidadosamente, sin disturbar el DEAE. Se extraen dos mililitros, uno por tubo. Con cuidado se llena la columna con PBS; ésta se mantiene llena todo el tiempo. Para terminar, se extraen 13 mililitros, uno por tubo, y se mide la concentración en dioptrías ópticas (OD), a 280 nanómetros de todos los tubos, incluyendo los de desecho.

#### E. Conjugación de la enzima con la Gama-globulina

Para este proceso, se centrifugan 5,000 unidades de fosfatasa

\* DEAE: Anion Exchanger suspension in 0.5 Molar of NaCl with 25% Ethanol (Sigma Chem. Company No I 6505)

alcalina, se colocan en un tubo de precipitado y se desecha el líquido sobrenadante. El precipitado se disuelve en dos miligramos de gammaglobulina purificada. Se dializa tres veces en contra de PBS. Se le adiciona glutaraldehído en solución acuosa, mezclándolo bien, hasta llevarlo a una concentración final de 0.06 por ciento. 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. Finalizando, se le adiciona albúmina de huevo para llevarla a una concentración de 5 miligramos por mililitro y se guarda en refrigeración a 4°C, por tiempo indefinido, en tubos previamente siliconados.

#### F. Establecimiento del experimento

El crecimiento de plantas para la investigación de virus requiere de condiciones especiales y controladas.

Las medidas sanitarias deben de ser tomadas en cuenta porque varios virus son fácilmente diseminados en varias formas; artropodos, insectos, etc.

Es necesario corregir condiciones climáticas y facilitar el crecimiento de las plantas fuera de su temporada normal, así como para inducir susceptibilidad máxima para la infección experimental con los virus involucrados.

Para obtener estudios más precisos de los efectos e interacciones de los factores ambientales y su influencia en las reacciones de los hospederos, el uso de invernaderos es esencial.

El presente trabajo se llevó a cabo en invernadero y laboratorios del proyecto "APROCAR-UVG" situados en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, zona 15, Vista Hermosa III en la ciudad capital. Dichas instalaciones se encuentran a una altura de 1500 mts. S.N.M.

Las plantas se colocaron en el invernadero y bajo sombra para poder tener un mejor control de las condiciones ambientales como lo son: viento, luz, temperatura y humedad.

El tipo de cardamomo que se escogió para este estudio, es el llamado cardamomo "pache", el cual tiene varias características similares al cardamomo de Malabar, como lo son: una altura que raramente excede los 2.7 metros de altura, ramas cortas, hojas pubescentes en la superficie inferior; florescencias de hasta 1 metro de largo, postradas; con frutos pequeños redondos. Se ha reportado como susceptible al virus del mosaico.

Estas plantas de cardamomo "pache", se trajeron de viveros libres del VMCar de la Costa Sur, los cuales tiene la Asociación de Productores de Cardamomo (APROCAR) para sus asociados.

La edad de estas plantillas, al momento de sembrarlas en cajas, fue de 90 a 120 días. El medio en el cual se sembraron fue en una mez-

cla de 1:1:1, una parte de tierra negra, una de arena y una de materia orgánica. El número de plantillas por caja es de 12, distribuidas en cuatro hileras con 3 plantillas por hilera. Las cajas utilizadas son de plástico con las siguientes dimensiones: largo 0.53 cms, ancho 0.36½ cm, altura 0.15 m con un volumen de 0.029 metros cúbicos.

Se utilizaron estas cajas pues en pruebas realizadas con anterioridad en el crecimiento de plantas de cardamomo, se consideró el uso de macetas pequeñas y subsecuentemente trasplantarlas, a macetas de tamaño standard (10 u 11 cm de diámetro), pero ésto drásticamente decreció la susceptibilidad; por ésto y por ser menor el número de cajas a utilizar y más fácil su manejo, es que se escogió el uso de las cajas. A estas cajas, se les abrieron agujeros para tener un adecuado drenaje y aereación en la parte del fondo de las mismas.

#### G. Establecimiento de la Metodología de Inoculación

Al establecer, la metodología de inoculación a seguir, se ha estudiado cuales son los fenómenos naturales, que tienen un efecto y daño mecánico sobre las plantas.

Se ha concluído que el viento, los insectos, los animales y el agricultor en la limpia, puede provocar daños de tipo mecánico a la planta y de acuerdo con cada caso, se han establecido los cinco métodos que son:

- a) Frotado de la hoja con Carborundum,
- b) Aire a presión más Carborundum,
- c) Inyectado en el tallo,
- d) Cortes en el tallo,
- e) Pinchazos en las hojas.

Correspondiente cada uno a un tipo de daño que se encuentra en la naturaleza y que puede ocurrir por la intervención del hombre.

Como aclaración, Carborundum, es un producto artificial, muy duro, constituido por carburo de silicio y se utiliza como abrasivo.

a) En el primer método de frotado de la hoja con Carborundum, se aplica el Carborundum en el haz y envez de la hoja y luego se frota. Esta operación se realiza para dañar las células del tejido y permitir el acceso del virus, esta acción es similar a la natural producida por el viento, acarreando arena y polvo. Después de frotar con Carborundum la hoja, se aplica el macerado conteniendo el virus. Fig. 5 y 6.

b) El segundo método utilizado fue el de la aplicación de aire a presión conteniendo el Carborundum más el macerado con virus y se realiza utilizando una pistola de soplete con presión entre 30 a 40 libras x pulgada cuadrada (13 a 18 kg x centímetro cuadrado). Fig. 7.

Esta presión se encontró la más adecuada para penetrar el tejido de la hoja sin arrancarlas del tallo. Para llegar a esta conclusión, se realizaron varias pruebas, sólo soplando el aire.



FIGURA 5

Aplicación del abrasivo Carborundum, para  
luego realizar la inoculación por el  
método de frotado de la hoja.

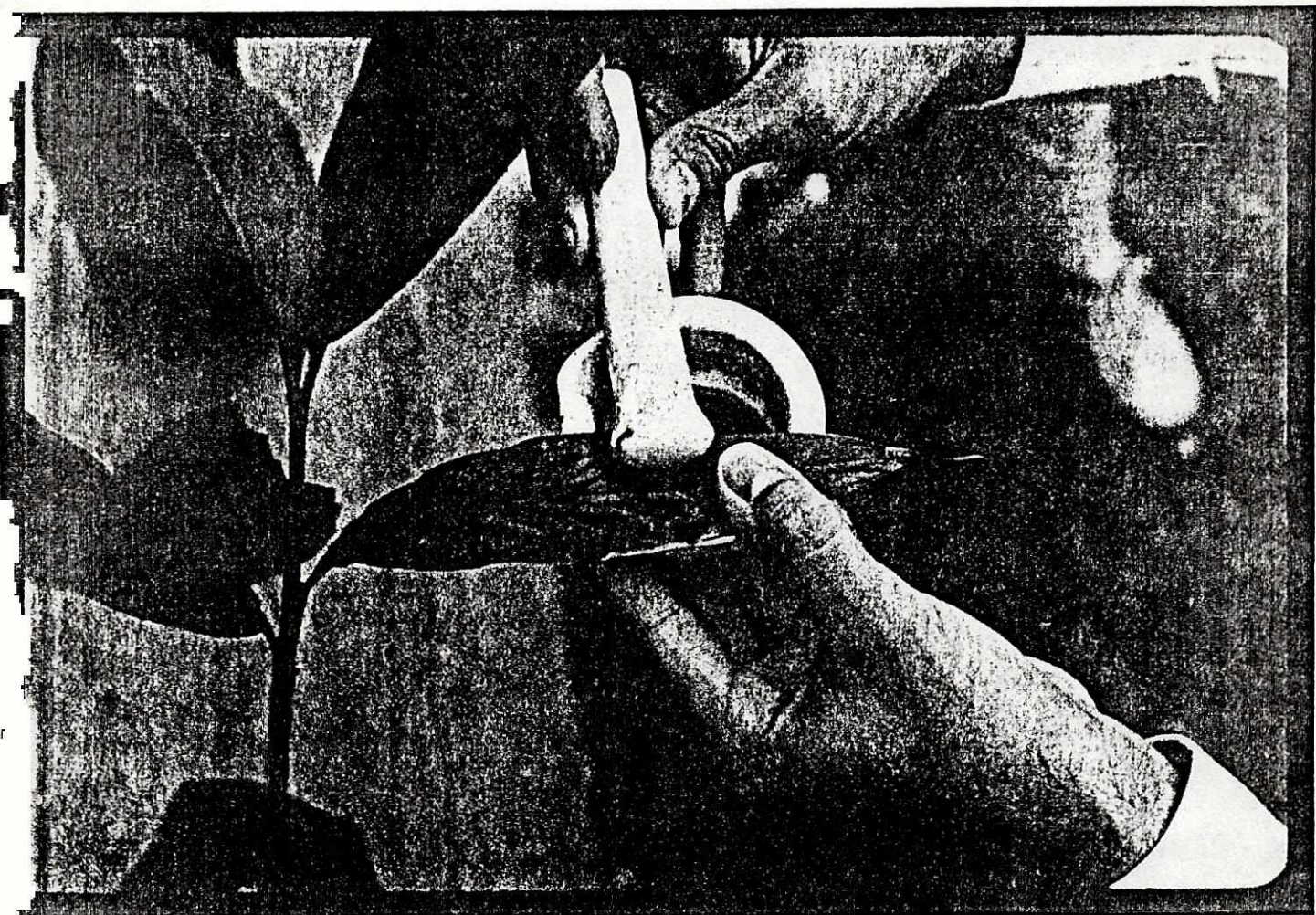


FIGURA 6

Método de inoculación de frotado de la hoja  
más Carborundum.

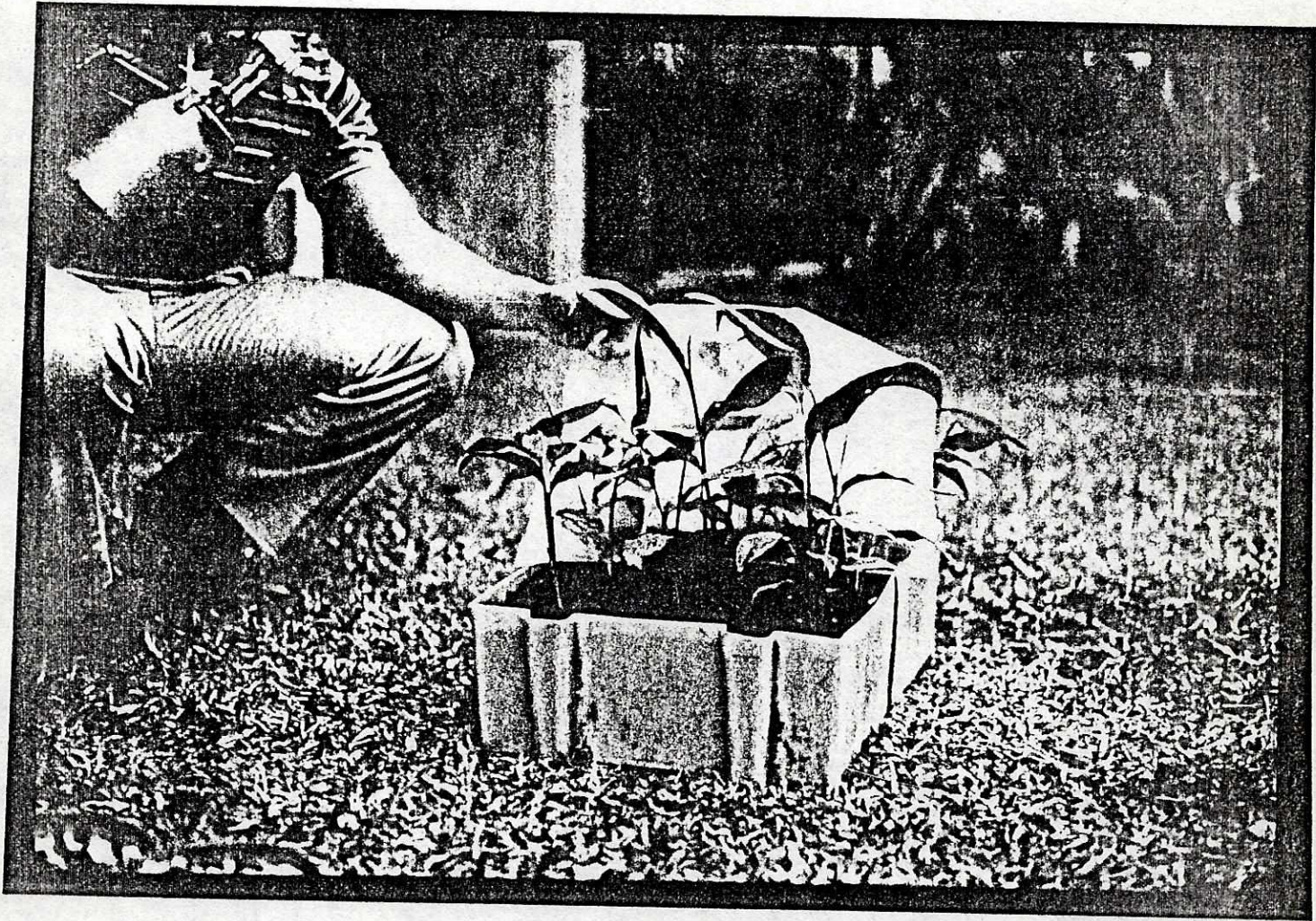


FIGURA 7

Método de inoculación de aire a  
presión más Carborundum

La aplicación se lleva a cabo ajustando la boquilla de la pistola del soplete hasta conseguir una película fina de la mezcla de carbundum más el macerado conteniendo el virus.

c) El tercer método, que es el inyectado en el tallo, es una solución de macerado más virus, que es lo que ocurriría al ser inoculado el virus, por los insectos en la naturaleza.

Este método se realizó por medio del uso de una jeringa ipodérmica, con capacidad de cinco centímetros cúbicos y una aguja de 0.5 mm de diámetro. Dicha jeringa contenía su capacidad de 5 cc con el macerado más el virus, previamente filtrada y se procedió a inyectar en los tallos que tenían un grosor de media pulgada, (1.3 cm).

Dependiendo del número de tallos, así era el número de aplicaciones por planta. La aplicación se hizo a una altura de 15 cm del cuello de la planta. Fig. 8.

d) El cuarto método de cortes en el tallo consiste en hacer incisiones en el tallo e inocular el virus vertiendo gotas en las incisiones. En el campo podría ser por medio de roedores o animales que golpeando el tallo, le provocan heridas a la planta; también en el momento de labores culturales, como el de desbajado con la utilización de machete. Fig. 9.

e) El último método, el quinto, es el de pinchazos en las hojas que luego de perforadas se les inocula el macerado con virus en ambas

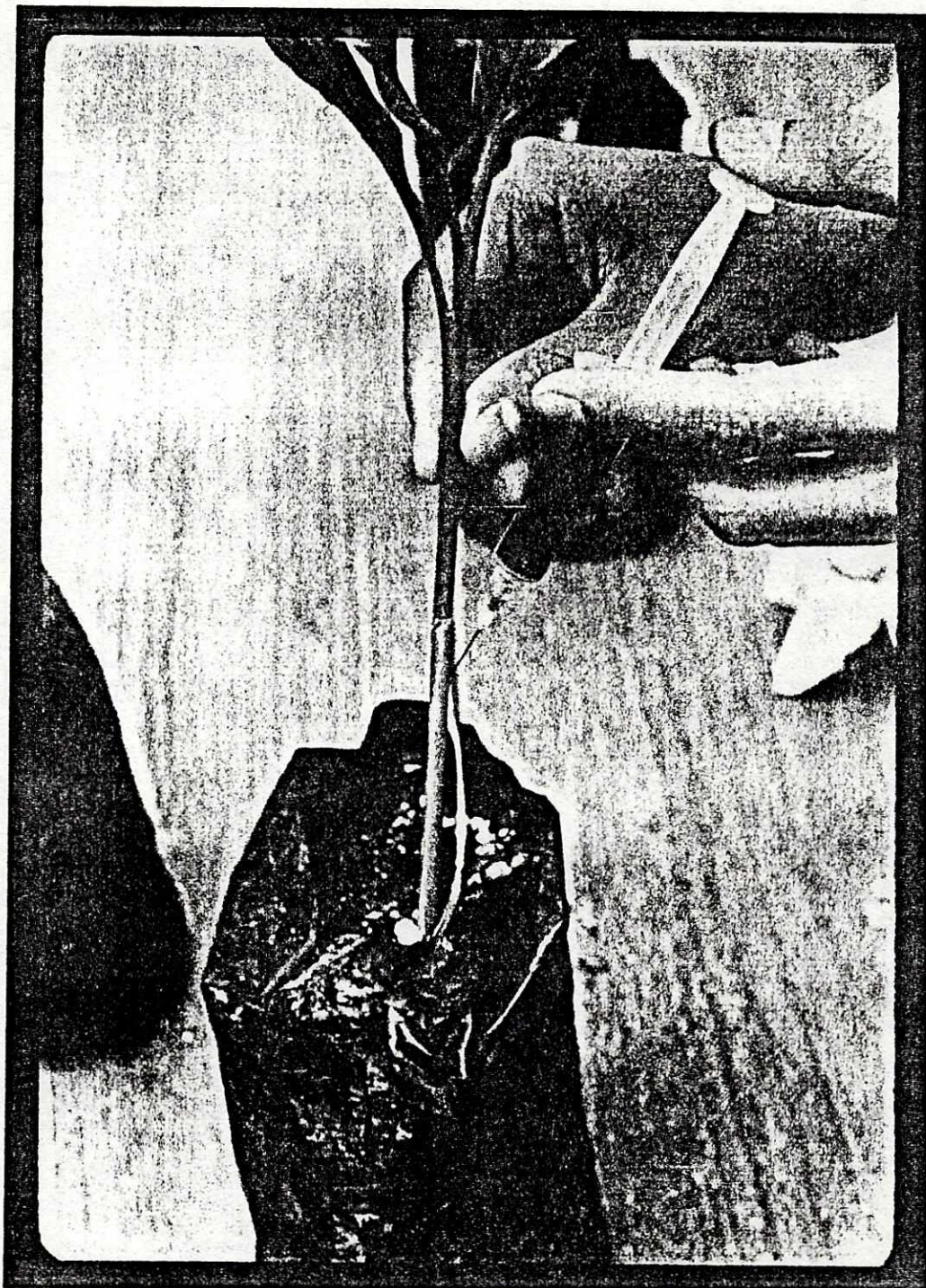


FIGURA 8

Método de inoculación de  
inyectado en el tallo



FIGURA 9  
Método de inoculación por  
cortes en el tallo

superficies de la hoja. Fig. 10.

Este método podría ocurrir por medio de insectos que pinchan a las plantas y luego por medio de la acción de las gotas de la lluvia, penetra el virus.

Al terminar la inoculación por los métodos antes descritos, se procede a lavar las plantas, con una película fina de agua, en forma de brisa suave, ésto se logra haciendo uso de una manguera y el pitón graduado en fino, para remover el exceso de macerado con virus y así reducir la penetración del virus a la planta por la vía del respectivo método. Fig. 11.

De no llevarse a cabo lo mencionado anteriormente, las plantas presentan hojas marchitas, quemadas, casi secas, por efecto del macerado que no fue removido.

La figura 12 presenta una vista parcial de las plantas inoculadas y lavadas, las cuales se encuentran en el invernadero.

#### H. Buffers

Para la elaboración de este trabajo se utilizaron buffers de Tris, de borato, de fosfatos, una combinación de acetato-fosfato y Tris, a diferentes concentraciones, yendo éstas desde 6 a 10. Todos los buffers se mezclaron con hojas enfermas maceradas, para asegurar la introducción en las mismas, del VMCar.

Se hace la aclaración que buffer es una mezcla de ácidos débiles y

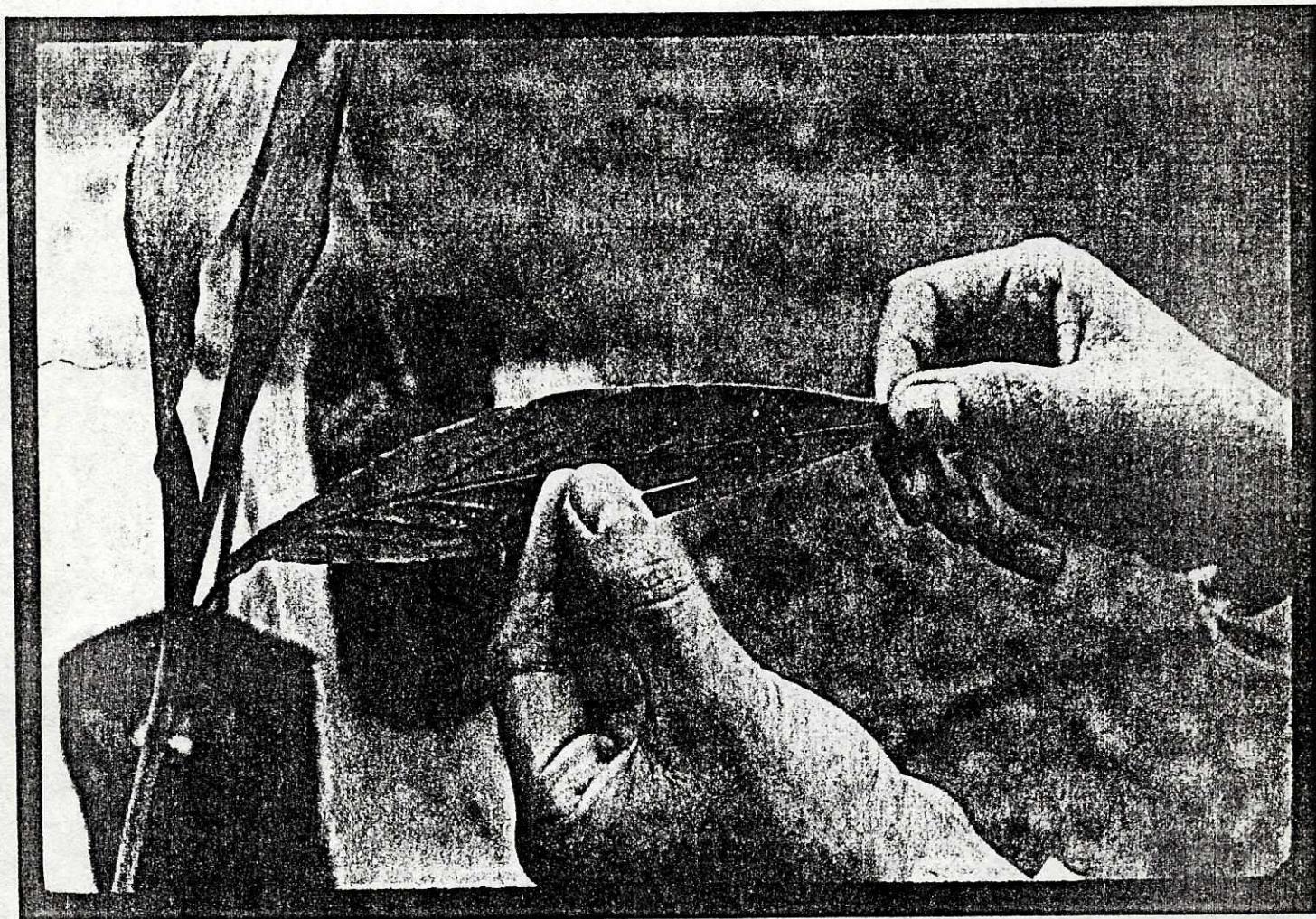


FIGURA 10

Método de inoculación por  
pinchazos en la hoja

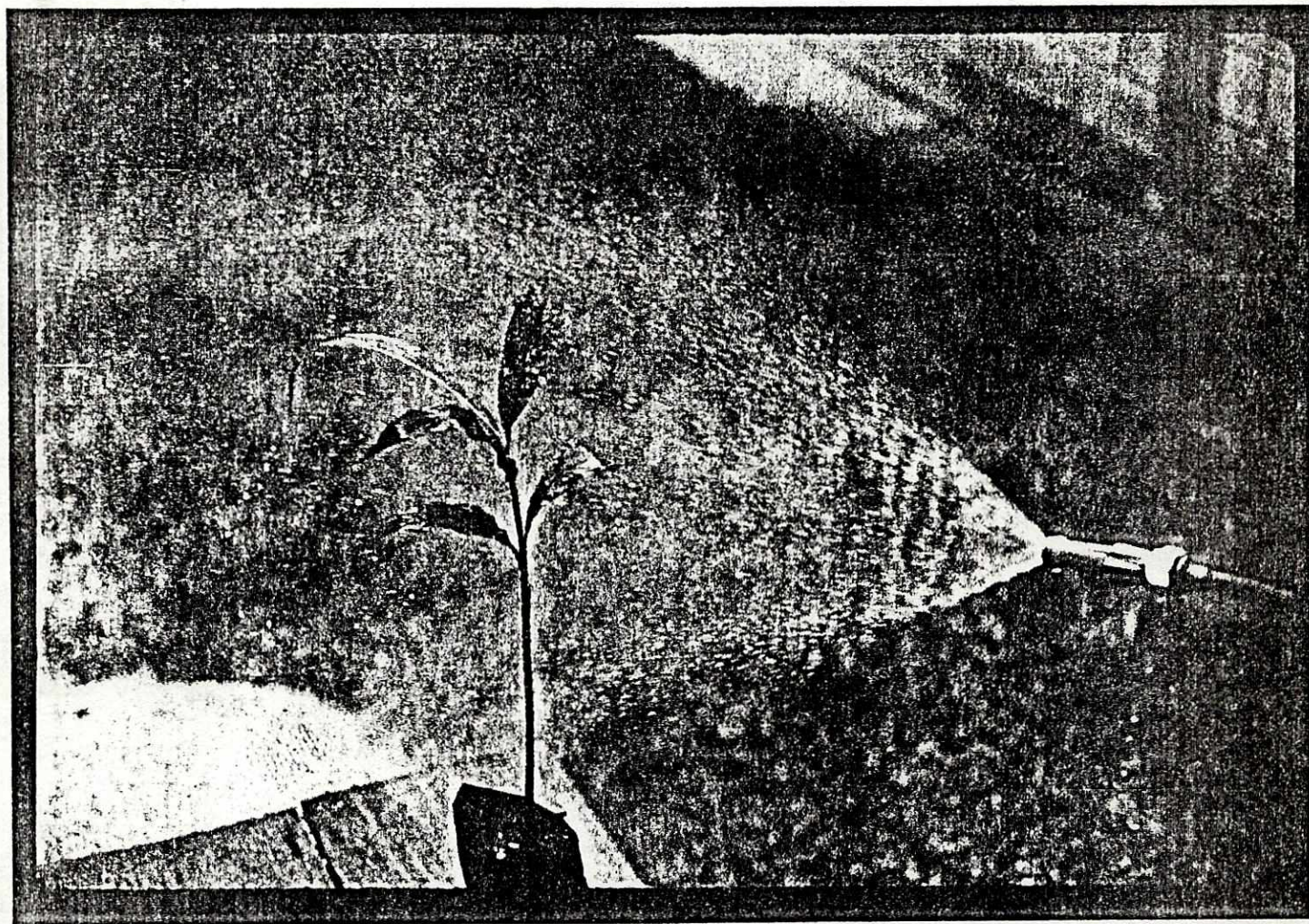


FIGURA 11

Sistema de lavado de plantas para la  
eliminación de exceso de macerado con virus  
después de las inoculaciones.



FIGURA 12

Vista parcial de las plantas inoculadas  
en el invernadero.

su sal o base débil y su sal que amortigua el efecto sobre el pH de una base o un ácido adicionado, asimismo, es regulador del pH, es decir mantiene el pH aproximadamente igual, siendo por las características indicadas, el medio de vida adecuado para el VMCar y por eso se utiliza en la transmisión mecánica.

#### I. Tratamiento especial previo a la inoculación

Todos los métodos mencionados anteriormente más los buffers, se utilizaron en otra fase de este trabajo, el cual consistió en darles a las plantas un tratamiento específico para incrementar la susceptibilidad a la inoculación mecánica y es el de un período de obscuridad preinoculación.

Este período fue de cuatro días a obscuridad total. Previo a inducir las a obscuridad, se les dió un buen riego y luego se procedió a almacenarlas en una bodega con una temperatura promedio de 18 a 20°C, con una humedad relativa del 65%.

La inoculación para ambos tratamientos se llevó a cabo al atardecer, pues se observó que desarrollan las plantas lesiones más rápidamente que de inoculaciones hechas por la mañana o al medio día.

El número total de plantas que se utilizan para ambos tratamientos y los diferentes métodos y buffers, es de 400. En el tratamiento sin el período de obscuridad se utilizaron plantas, 6 plantas por tratamiento y por buffer, con 2 repeticiones. En el tratamiento de obscuridad

previa a inoculación, el mismo número de plantas sólo que una sólo replica. Las plantas restantes, que son 40, son plantas con 3 meses de diferencia, mayor que las demás. En esta parte, se utilizaron 2 plantas por tratamiento y buffer. Esto se efectuó con el propósito de ver si habría una diferencia marcada entre plantas jóvenes y unas un poco mayor, al momento de inoculación y efectos o síntomas posteriores.

La figura 13, es un esquema de la secuencia de las etapas del proceso de inoculación.

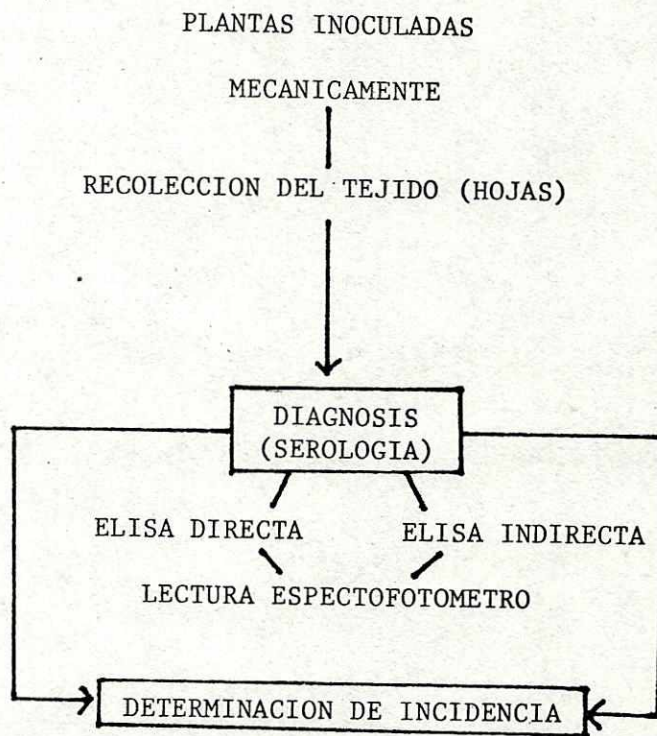


FIGURA 13

PASOS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DEL VIRUS DEL  
MOSAICO DEL CARDAMOMO POR INOCULACION MECANICA

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Para determinar la presencia del virus del mosaico del cardamomo (VMCar), en las plantas tratadas, se utilizó la técnica serológica de ELISA directo e indirecto.

Con el criterio de que cualquier muestra sometida a la técnica de ELISA directo, cuyo valor fuera mayor que el control negativo multiplicado por dos, fuera considerada infectada, se proceda entonces a presentar los resultados.

El Cuadro 2, muestra el método de inoculación y su incidencia de infestación. El mayor porcentaje de plantas infestadas lo constituye el método por inyectado en el tallo, le sigue el método de aire a presión más Carborundum y por último el de cortes en el tallo.

El Cuadro 3, muestra la incidencia de plantas infectadas, en porcentaje por cada tipo de buffer utilizado. Como se puede observar, el mayor porcentaje cincuenta por ciento, fue producido por el buffer Tris-hidroximetil amino metano con un pH 9.0, le sigue el buffer de Mono -1) Disodio hidroxifosfato con pH 9.0.

Cuadro 4, el mayor porcentaje de plantas infectadas con el buffer de fosfatos y a más corto plazo, de la aplicación está representado por el método de inyectado en el tallo con un porcentaje total de 33.33%, lo que constituye el doble de los otros métodos.

El método de frotado de la hoja con Carborundum, el de cortes

CUADRO 2 PORCENTAJE DE PLANTAS INFECTADAS POR  
EL METODO DE INOCULACION

METODO DE INOCULACION	% DE PLANTAS INFECTADAS
CORTES EN EL TALLO	16.7
INYECTADO EN EL TALLO	29.2
AIRE A PRESION + CARBORUNDUM	21.0



CUADRO 4 PLANTAS INFECTADAS POR MES DESPUES DE LA INOCULACION MECANICA  
UTILIZANDO EL BUFFER DE FOSFATOS

METODO DE INOCULACION	MESES						TOTAL PLANTAS INFECTADAS %
	1	2	3	4	5	6	
FROTADO DE LA HOJA CON CARBORUNDUM	--	--	--	8.3	8.3	16.6	16.67
AIRE A PRESION MAS CAR- BORUNDUM	--	--	--	--	8.3	8.3	8.33
INYECTADO EN EL TALLO	--	--	8.3	33.3	33.3	33.3	33.33
CORTES EN EL TALLO	--	--	--	16.6	16.6	16.6	16.67
PINCHAZOS EN LA HOJA	--	--	--	8.3	8.3	16.6	16.67

NOTA: Los datos son expresados en % de plantas infectadas.

en el tallo y pinchazos en las hojas, le siguen en menor incidencia respectivamente.

El método de aire a presión más carborundum aparece apenas al quinto mes de la inoculación, alcanzando un porcentaje de 8.33%.

El cuadro 5, muestra los resultados en los que se utilizó buffer Tris (Tris-hidroximetil amino metano). Se obtuvieron resultados al tercer mes, en los métodos de frotado en la hoja más carborundum y en el inyectado del tallo. En el método de corte en el tallo, de inyectado en él y de aire a presión más carborundum muestran un porcentaje igual de plantas infectadas 53.33%, resultados obtenidos hasta la fecha aunque la observación y análisis continúan hasta completar un período de 12 meses.

Las plantas que no fueron sometidas a un período de pre-inoculación de obscuridad total, lograron alcanzar una altura promedio de 1.55 m con un follaje denso, buen color, buena cantidad de retoños y hojas por tallo.

Mientras que las plantas que si fueron sometidas al período pre-inoculación de obscuridad total, sí se vieron resentidas a causa del stress al cual se les sometió.

Las plantas se dañaron mucho más luego de la aplicación de los diferentes métodos de inoculación que las que no estuvieron bajo el período de pre-inoculación. Otro factor a considerar, es que las

CUADRO 5 PLANTAS INFECTADAS POR MES DESPUES DE LA INOCULACION MECANICA  
UTILIZANDO EL BUFFER DE TRIS

METODO DE INOCULACION	MESES						TOTAL PLANTAS INFECTADAS %
	1	2	3	4	5	6	
FROTADO DE LA HOJA CON CARBORUNDUM	--	--	8.3	16.6	16.6	16.6	16.67
AIRE A PRESION MAS CARBORUNDUM	--	--	--	8.3	8.3	33.3	33.33
INYECTADO EN EL TALLO	--	--	16.6	33.3	33.3	33.3	33.33
CORTES EN EL TALLO	--	--	--	33.3	33.3	33.3	33.33
PINCHAZOS EN LA HOJA	--	--	--	16.6	16.6	25.0	25.00

NOTA: Los datos son expresados en % de plantas infectadas.

plantas no lograron pasar un nivel de desarrollo normal, permanecieron algo marchitas, con muy poco follaje, las hojas no alcanzaron un tamaño normal de acuerdo a la edad de las plantas, mucho menos la altura, la cual no excedió de 0.75 m, el número de retoños nuevos fue muy bajo; un treinticinco por ciento de el total de las plantas utilizadas bajo el tratamiento de pre-inoculación, se murió, no resistió el tratamiento.

Debido a lo expuesto anteriormente, no fue posible someter material de estas plantas a la técnica de ELISA directo, pues no se contó, en el transcurso del trabajo, con el suficiente material para poder efectuar la prueba a la cual debía de ser sometidas. Es por ésto, que no presentó resultados algunos de esta etapa.

En el trabajo de investigación que se llevó a cabo para comprobar si el virus del masaico del cardamomo (VMCar) puede ser transmitido por medios mecánicos, se han escogido los siguientes métodos de inoculación:

1. Frotado de la hoja con Carborundum.
2. Aire a presión más Carborundum.
3. Inyectado en el tallo.
4. Cortes en el tallo.
5. Pinchazos en las hojas.

Estos tienen su equivalente en la naturaleza en la forma siguiente:

El número 1, es producido en forma natural por la fricción entre hojas y tallos de las plantas provocada por viento y por acción de animales y personas.

El número 2, acción producida por el viento, al acarrear arena y polvo.

El número 3, la acción del estilete de un insecto que penetra el tejido e inocular el virus si está contaminado.

El número 4, rotura de tallos producido por animales, peones, en las diferentes labores culturales del cultivo.

Y el número 5, podría ocurrir por medio de insectos que penetran a las plantas y luego por medio de la acción de las lluvias penetra el virus.

Para comprobar la efectividad de los diferentes métodos usados de inoculación, se utilizó la técnica serológica de ELISA-directo.

Los resultados de la inoculación mostraron que tanto los métodos como los buffer, los cuales escogidos para no provocar daños químicos, sino únicamente ser el medio de vida del virus; presentan diferentes porcentajes de plantas infectadas. Esto nos comprobó la hipótesis inicial de que VMCar puede ser transmitido por acción mecánica.

## V. CONCLUSIONES

Después de haber presentado los métodos y resultados obtenidos, llegamos a las siguientes conclusiones:

1. Se ha podido establecer que es efectiva la transmisión mecánica del virus del mosaico del cardamomo (VMCar).
2. Los métodos de inoculación con la mayor incidencia de transmisión del VMCar, han sido:
  - Inyectado en el tallo
  - Cortes en el tallo
  - Aire a presión más Carborundum
3. Los mejores buffers para la transmisión del VMCar, lo constituyen:
  - Buffer de fosfatos (Mono-Disodio Hidroxifosfato) Ph 9.0.
  - Buffer de Tris (Tris-Hidroximetil amino metano) Ph 9.0.

Las ventajas que obtenemos de este trabajo son dos:

1. Que utilizaremos en la búsqueda de variedades resistentes al VMCar, el método de mayor incidencia que nos ahorrará tiempo y dinero.
2. Al conocer cuál de las acciones naturales afectó más, en nuestro caso, el viento, nos da la pauta de cómo podemos proteger las plantaciones al reducir la acción del viento sobre la misma.

Esto podría conseguirse mediante cortinas a distancias adecuadas, hechas con árboles o algún otro material, según la conveniencia y posibilidad de costos.

Un fenómeno interesante fue el comportamiento distinto de las plantas que fueron mantenidas en obscuridad total por cuatro días previa inoculación, las cuales después de la inoculación, no pudieron recuperarse en su totalidad, mientras que las que no sufrieron este proceso, no presentaron señales visibles de estar afectadas por la inoculación.

Esto indicaría que una planta mantenida en sus condiciones óptimas ecológicas climáticas y nutricionales, podrían ser casi inmunes a la inoculación. Esto se deberá investigar con más detenimiento.

El objetivo final de todos los trabajos realizados es lograr métodos de defensa de las plantaciones ya sea por reducción de los fenómenos que tienen mayor incidencia de infestaciones; utilizar plantas libres del VMCar y de preferencia plantas resistentes al VMCar obtenidas a base de fitomejoramiento.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. ABRAHAM, P., Now Better Possibilities with Cardamom. *Plant. Chron.* 52,3: 65, 73. 1957.
2. ALVARADO, C. M., El Cultivo del Cardamomo. Guatemala, Dirección General de Servicios Agrícolas, s.f. 36 p.
3. 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.
4. AMEZQUITA, M. O., Técnicas de Producción Utilizadas en el Cultivo del Cardamomo (Elettaria Cardamomum L.) según tamaño de explotación agrícola en Alta Verapaz. Tesis de Ing. Agr. Guatemala, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos, 1979.
5. BAWDEN, F. C., *Plant Viruses and Plant Virus Diseases*, 3rd. Ed. *Chronica Botanica*. Waltham, Massachusetts, 1950.
6. BENNETT, C.W., Acquisition and Transmission of Viruses by Dodder (Cúscuta subinclusa). *Phytopathology* 30:2, 1940.
7. BENNETT, C. W., Latent Virus of Dodder and its effect on Sugar Beet and other plants. *Phytopathology* 34:77-91, 1944.
8. BONILLA, O., Búsqueda de Fuentes de Resistencia y Métodos de Diagnósis al Virus del Mosaico en Cardamomo. Tesis de Ing. Agr., Guatemala, Departamento de Ciencias Agrícolas, Universidad del Valle de Guatemala, 1983.
9. BORROR, D. J., De Long, D.M. and Triplehorn, Ch. A. *An Introduction to the Study of Insects*. New York, Holt, Rinehart and Winston. 4th. ed., 1976 pp. 708-711.
10. CANO, M. F. Cultivo del cardamomo. Guatemala, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Unidad de Formación de Recursos Humanos, 41 p., 1985.
11. CAPOOR, S. P., Katte Disease of Cardamom. Kerala India, Cardamom Board, 1967. P. 25-36.
12. CARROLL, T. W., P. L., Gosseland & E.D. Hockett. Resistance to Cucumber Mosaic Virus Transmition by Aphids in Cucumis melo. *Phytopathology* 69: 1223-1225, 1979.
13. CLARK, M.F. & A.N. ADAMS, Characteristics of the Microplate Method of Enzime-Linked Inmunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483, 1977.
14. CLARKE, R.G., R.H., Converse & M. KOJIMA. Enzime-Linked inmunosorbent Assay to Detect Potato Leafroll Viruliferous Aphids. *Plant Disease* 64: 43-45, 1980.

15. COOK, A.A., Genetics of Response in Pepper to three Strains of Potato Virus Y. *Phytopathology* 53: 720-722, 1963.
16. CRONQUIST, A., *Introducción a la botánica*. 2 ed. México D.F., Continental, 1981. 84 p.
17. CROOK, N. E. & C. C. PAYNE. Comparison of Three Methods of ELISA for Baculoviruses. *J. Gen. Virol.* 46: 29-37, 1980.
18. CUNILLERA, A. *El Mundo de las Plantas*, Barcelona, Ed. Mateu, 1965.
19. CHERIAN KUNJU, N. E. Cardamom Market Expansion. *Abstracts on Tropical Agriculture* 8(1):111. 1982.
20. Descripción Botánica y Condiciones Ecológicas para el Cultivo del Cardamomo. *In* Simposio de cardamomo, Iro., Guatemala, 1985. Memorias. Guatemala, APROCAR, 1985. pp 1-12.
21. DIEZ, M. Diagnóstico del Virus del Mosaico del Cardamomo Utilizando la Técnica Enzima Conjugada (ELISA). Tesis Ing. Agr., Guatemala Departamento de Ciencias Agrícolas, Universidad del Valle de Guatemala, 1982, p. 50.
22. DIMITMAN, J., An Aphid Transmitted Viruses of Cardamom on Guatemala. *Phytopathology Abstracts* 71: 104, 1981.
23. Divisas por 62 millones deja el cardamomo. *Prensa Libre*, Guatemala, julio 25, 1984:4.
24. Estadísticas de los principales productos agrícolas de consumo interno y de exportación. *Informe Económico* 29(4): 83-101. 1982.
25. FLORES, M.D., *El Mosaico del Cardamomo*. La Cámara del Agro, Guatemala, C.A., 1980.
26. GIBBS, A. & B. HARRISON., *Plant Virology, the Principles*. 1st. Ed. Edward Arnold. Great Britain, 1976.
27. GONSALVES, D., Indirect ELISA for Cardamom Mosaic Virus. Laboratory notes. New York State Agricultural Experiment Estation, Cornell University, New York, 1983, p. 2.
28. GUATEMALA, Banco de., *Informe económico*. Abril-septiembre, 1979. Guatemala, C.A., 1979, p. 68.
29. HENTZE, F.W., Estudio preliminar sobre la virosis del cardamomo (*Elettaria Cardamomum*). Tesis Ing. Agr., Guatemala, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos, 1982.

30. Instituto Técnico de Capacitación y Productividad. Manual de cultivo del cardamomo. Guatemala, 1981. 29 p.
31. JOHNSON, F., The Complex Nature of White Clover Mosaic. *Phytopathology* 32: 103-116, 1942.
32. KADO, C.I., Principles and Techniques in Plant Virology. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1972. P. 3-26.
33. LANG, F.P., La flor, polinización y polinizadores del cardamomo (*Elettaria Cardamomum*) en Cobán, Alta Verapaz. Tesis de Ing. Agr., Guatemala, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos, 1982. pp 8-11.
34. LINDNER, R.C., KIRKPATRICK, H.C. and WEEKS, T.E. *Phytopathology* 49, 78, 1959.
35. LUTTMANN, N.T., El cardamomo y su cultivo. Guatemala, Edinter, 1985. 84 p.
36. MACKAY, W.S., Cardamom: an ancient spice of Malabar. *Abstracts on Tropical Agriculture* 9(7): 130. 1983.
37. MARAMOROSCH, K., The Atlas of Insect and Plant Viruses. New York Academic Press, 1977. P. 311-315.
38. MARAMOROSCH, K. and HILARY, K., Methods in Virology. New York Academic Press, 1967, VOL. 1 P. 393-401, 403-410.
39. MARAMOROSCH, K. and HILARY, K., Methods in Virology. New York, Academic Press, 1967, Vol. 4. P. 53-54, 89.
40. MATTHEWS, R.E.F., Plant Virology. New York, Academic Press, 1970. P. 419.
41. MEJIA, J.R. y MONROY, V.M., La reina de las especies "cardamomo". Extensión y Asesoría Técnica del Programa APROCAR-UVG. Guatemala, 1985.
42. MENENDEZ, C., Zonificación del Virus del Mosaico del Cardamomo en Guatemala y su Distribución en la Planta de Cardamomo (*Elettaria Cardamomum*). Tesis de Ing. Agr., Guatemala, Departamento de Ciencias Agrícolas, Universidad del Valle de Guatemala, 1984.
43. MINK, G.I., Identification of Rugose Mosaic-Diseased Cherry Trees by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Plant Disease* 64: 641-694, 1980.

44. MOLINA, A., El cardamomo y su cultivo. Guatemala, Instituto Técnico de Capacitación y Productividad, 1980. pp. 14-28.
45. MONROY, V., Efecto de escarificación y de tres estimuladores de la germinación en semillas de cardamomo (Elettaria Cardamomum (L) Maton) bajo condiciones de laboratorio y de campo. Tesis de Ing. Agr. Guatemala, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos, 1985.
46. NAMBIAR, M.C., PILLAI, G.B. and NAMBIAR, K.K., Diseases and pest of cardamom, a resume of research in India. Abstracts on Tropical Agriculture 2(12):148. 1976.
47. OVERDICK, F.J., El Cultivo y Beneficio Práctico del Cardamomo. Tesis, Escuela de Agricultura Barcenás, Villa Nueva. Guatemala, C. A., 1960.
48. PARRY, J. W., Spices. Vol I and II. Chemical Publishing Co., Inc., New York, 1969. p 235 and 245.
49. RAO, D.G. and NAIDU, R., Studies on "Katte" or "Mosaic" Disease of Small Cardamom. Review of Plant Pathology, Vol. 56, No. 3. P. 129-136. 1975.
50. Regaining the ground. Abstracts on Tropical Agriculture 9(7):130. 1983.
51. ROSENGARTEN, F. Jr., The Book of Spices. New York, Pyramid Books, s.f.p. 162-173.
52. SAHADEVAN, P.C., Cardamom. Trivandrum, India. 1965. p.41.
53. SAHASRABUDDHE, D. L., The Spices Garden of Sirsi in Kanhra, Department of Agriculture, Bombay Vol. No. 83, Chapter 5, 1917.
54. SHANMUGANATHAN, N. & G. FLETCHER, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Fanleaf Virus in Grapevines Grown in Containers. Plant Disease 66: 704-707, 1982.
55. SAMAYOA, J.C. and SUCHAND, G.J., Cardamom (Elettaria Cardamomum). San Luis Obispo, California Polytechnic State University, 1977. 28 p.
56. SIEGEL, A. and M. ZAITTEIN, Infection Process in Plant Virus Diseases Annu. Rev. Phytopathology 2: 179-202, 1964.
57. TAKAHASHI, W. N., Increasing the Sensitivity of the Local-lesion Method of Virus Assay. Phytopathology 46: 654-656, 1956.
58. TAYLOR, C.E., The Multiplication of Longidorus elongatus (de Man) on Different Host Plants with Reference to Virus Transmission. Ann. Appl. Biol. 59: 275-281, 1967.

59. TEAKLE, D.S., Fungi as Vectors and Hosts of Viruses, p. 23-54. In K. Maramorosch (Ed.) Viruses, Vectors and Vegetation. New York Interscience, 1969. p. 666.
60. THOMAS, P.E. and R.W. FULTON, Correlation of Ectodesmata Number with Nonspecific Resistance to Initial Virus Infection. *Virology* 34: 459-469, 1968.
61. VARMA, P.M. & S.P. CAPPOR, Mosaic Disease of Cardamom and its Transmition by the Banana Aphid. *Indian J. Agri. Sci.*, 28: p. 97-108, 1958.
62. VARMA, P.M., The Banana Aphid (*Pentalonia nigronervosa*) and the Transmition of "Katte" Disease of Cardamom. *Indian Phytopathology*. 15, 1: 1-10, 1962.
63. VOLLER, A., et al. The Detection of Viruses by Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* 33: 165-167, 1976.
64. WATSON, M.A., Epidemiology of Aphid Transmitted Viruses. *Outl. Agr.* 5: 155-166, 1967.
65. WILLIAMS, C.N. and CHEW, W.Y. *Tree and Field Crops of the Wetter Regions of the Tropics*. London, Longman, Group Ltd., 1980. P. 223-224.
66. WILLIS, J.C., *A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns*. 7th. Ed. (Rev. by H.K. Aire and Shaw). Cambridge University Press, 1966.
67. YARWOOD, C.E. and R.W. FULTON, Mechanical Transmission of Plant Viruses. P. 237-266. In K. Maramorosch and H. Koprowski (Ed.) *Methods in Virology*, Vol. 1, New York, Academic Press, 1967.