

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

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

ZONIFICACION DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL CARDAMOMO
EN GUATEMALA Y SU DISTRIBUCION EN LA PLANTA
DE CARDAMOMO (ELETTARIA CARDAMOMUM)

CESAR ESTUARDO MENENDEZ PEREZ

GUATEMALA

1984

ZONIFICACION DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL CARDAMOMO
EN GUATEMALA Y SU DISTRIBUCION EN LA PLANTA
DE CARDAMOMO (ELETTARIA CARDAMOMUM)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Ciencias Agrícolas

ZONIFICACION DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL CARDAMOMO
EN GUATEMALA Y SU DISTRIBUCION EN LA PLANTA
DE CARDAMOMO (Elettaria cardamomum)


CESAR ESTUARDO MENENDEZ PEREZ

Trabajo de investigación presentado para optar al título
de Ingeniero Agrónomo en el grado académico de
Licenciado en Ciencias Agrícolas

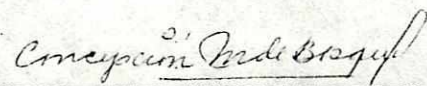
Guatemala

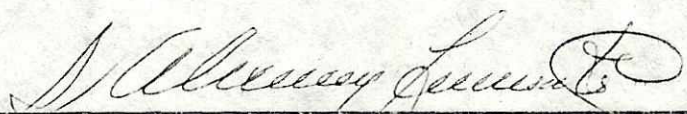
1984

Vc. Bo.:

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

Tribunal:

(f) 
Licenciada Concepción de Bosque

(f) 
Ingeniero Agrónomo Alejandro Fuentes (Ms.Sc.)

(f) 
Ingeniero Agrónomo José Manuel del Valle (Ms.Sc.)

Fecha de aprobación: 2 de noviembre de 1984.

A Dios

A mi esposa:

Pura María Barreda de Menéndez

A mis padres:

Licenciado César A. Menéndez M.
Licenciada Rosa Elena P. de Menéndez

A mi hermana:

Rosa Elena Menéndez Pérez

A mi abuelita:

Angelina v. de Pérez

A toda mi familia

A las siguientes personas:

Ingeniero Rolando Mansilla y Señora
Julio Rizzo
Señora Pura de Ross
Señora Francisca v. de James
German Morales

A la memoria de:

Medardo Pérez
Carlos Rolando Pérez
Jorge Cofiño

AGRADECIMIENTO

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

A Universidad del Valle de Guatemala.

Asociación de Productores de Cardamomo (APROCAR).

Ms.Sc. Julio Tejada Castillo,

Ingeniero Agrónomo Marco Tulio Urízar,

Ingeniero Agrónomo Oscar Bonilla.

A mis compañeros de trabajo del Programa APROCAR-UVG.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	5
A. Cultivo del cardamomo	5
1. Clasificación botánica	5
2. Ecología del cultivo	9
3. Propagación	10
4. Polinización	12
5. Importancia económica	12
B. Virus del mosaico del cardamomo	13
C. Métodos para detección de virus	17
1. Microscopio electrónico	17
2. Microscopio de luz	18
3. Plantas indicadoras	18
4. Métodos serológicos	19
D. La técnica inmunsorbente enzima conjugada ELISA (Enzymelinked inmunsorbernt assay)	21
1. Fundamentos de la técnica ELISA	21
2. Clases de la técnica ELISA	22
E. Análisis de las muestras	25

	Páginas
III. MATERIALES Y METODOS	25
A. Zonificación del virus del mosaico del cardamomo	25
1. Muestreo de plantaciones	25
2. Manejo y traslado de muestras	26
B. Distribución del virus del mosaico de cardamomo en plantas infectadas	27
C. Reactivos	29
1. Suero de conejo anti-virus	29
2. Suero de cabra-anti-conejo	29
3. Suspensión de secciones de hojas de cardamomo	30
D. Técnica ELISA-indirecta	30
E. Técnica ELISA-directa	33
F. Purificación de la gama-globulina	37
G. Conjugación de la enzima con la gama-globulina	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	41
A. Distribución del virus en la planta	41
B. Zonificación en Guatemala del virus del mosaico del cardamomo	46
V. CONCLUSIONES	59
VI. BIBLIOGRAFIA	61

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura		Páginas
1	Fotografía al microscopio electrónico	14
2	Síntomas del VMCar	16
3	Ficha de identificación para zonificación y diagnóstico del virus del mosaico del cardamomo	28
4	Principio de la técnica ELISA-indirecta	31
5	Principio de la técnica ELISA-directa	34
6	Datos de la distribución del virus en la planta	42
7	Comparación de la distribución del "VMCar" en plantas al sol y a la sombra para las distintas partes de la planta	44
8	Zonificación del virus del mosaico del cardamomo	54
Cuadros		
1	Resultados de las muestras de cardamomo analizadas sobre VMCar en la zona norte de Guatemala	47
2	Resultados de las muestras de cardamomo analizadas sobre VMCar en la zona sur de Guatemala	52

RESUMEN

El cultivo del cardamomo (Elettaria cardamomum) en Guatemala está incrementándose año con año, debido a los precios actuales en el mercado internacional, lo que representa una fuente importante de divisas al país, una creciente ocupación de mano de obra, un mejor manejo del cultivo y el fomento de programas nacionales de diversificación de cultivos.

Se analizó en el presente trabajo la distribución del virus del mosaico del cardamomo ("VMCar") en la planta, para conocer las partes que presentan las mayores concentraciones del patógeno, con el fin de utilizar estas partes en el muestreo de las plantas para la zonificación del VMCar en Guatemala. En dicho muestreo se utilizó la metodología de rastreo selectivo-inducido. Con la colaboración de técnicos y agricultores realizamos visitas periódicas a las distintas plantaciones cardamomeras del país. Simultáneamente a la recolección de muestras se dictaron conferencias sobre la importancia del cultivo y se dieron instrucciones precisas sobre la toma y el envío de muestras.

Para determinar si el virus estaba presente, se utilizó

la técnica inmunológica ELISA; para cuantificar la concentración del virus se usó un espectrofotómetro y para analizar las muestras positivas se utilizó un parámetro estadístico, la media de los controles negativos más tres desviaciones estándar, los datos arriba de esta cantidad son positivos. Otro parámetro matemático utilizado fue: se obtiene el promedio de los controles negativos, se multiplica por dos y todos los datos arriba de este número son positivos.

La mayor concentración de virus en la planta se dio en las hojas jóvenes cercanas al cogollo y los retoños de las plantas.

La diseminación del virus en la zonificación en Guatemala presenta un cuadro clínico de la siguiente manera: en el área de la costa sur, el 100 por ciento de las fincas productoras presentan problemas de virus, mientras que en el área del norte se detectaron siete focos de infección diseminados por la zona productora.

De no tomarse medidas pertinentes, la diseminación del virus en todas las áreas cardamomeras del país es inminente, con las consiguientes pérdidas económicas para los agricultores.

I. INTRODUCCION

El cultivo del cardamomo (Elettaria cardamomum Maton) ha tenido especial importancia en Guatemala debido a lo alto de su precio y a que el país cuenta con áreas ecológicas apropiadas para el desarrollo del cultivo.

Guatemala es el principal productor de cardamomo para el mercado internacional. 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, Chimaltenango, Sololá, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quezaltenango y San Marcos (2,3).

En 1979 se estima que se contaba con un área cultivada de unas 16,000 hectáreas, con una producción de 32,000 toneladas métricas de cardamomo pergamino (10). Actualmente, se están incrementando las plantaciones.

Según Amézquita (2), los rendimientos tienen un rango de 192 a 77 Kg. por hectárea* (tres a 12 quintales por manzana)** en pergamino. El informe económico del Banco de

* La manzana = .7 Ha.

** El quintal = 45 kilogramos

Guatemala indica que los rendimientos varían según la tecnología aplicada a las plantaciones, fluctuando la producción entre 177 a 578 Kg. (2.75 a nueve quintales) pergamino por hectárea (10).

Este cultivo fue introducido a Guatemala alrededor de 1920 en el departamento de Alta Verapaz. Por condiciones de clima y suelo adecuados, se propagó a otras regiones. Su introducción a la costa sur fue en el año de 1940 (5).

En la actualidad el cardamomo 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, Quezaltenango, en 1975 (7). Hasta el año de 1983, el autor del presente trabajo detectó personalmente 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-científica, pero se estima que la enfermedad afecta hasta un 70 por ciento de la producción actual de cada plantación de no tomar medidas pertinentes contra el virus. Asimismo podría aún terminar de manera definitiva con algunas plantaciones, si no se utilizan estrategias adecuadas de control. Cuando se plantan rizomas infectados con virus, estas plantas nunca llegarán a tener una producción que represente una inversión económicamente rentable.

Para el control del VMCar es necesario eliminar las plantas infectadas y las que se encuentran a su alrededor, además de controlar el vector y conocer los huéspedes alternos para eliminarlos. Por lo tanto, el agricultor debe de obtener la semilla (sexual) a sembrar, de plantas sanas.

El presente trabajo está incluido dentro del Programa creado entre la Asociación de Productores de Cardamomo y la Universidad del Valle de Guatemala (APROCAR-UVG), con la colaboración de la Universidad de Cornell, Estados Unidos de Norte América.

Los resultados de las investigaciones realizadas para este trabajo, pretenden contribuir al mejor aprovechamiento del cultivo de cardamomo en Guatemala.

El estudio de zonificación en Guatemala del virus del mosaico del cardamomo, tendrá una secuencia continua, durante varios meses después de entregado el trabajo. Esto se hace necesario debido a la propagación del virus tanto por sus transmisores, como por el traslado de material infectado a otras zonas. Otro aspecto importante es el muestreo de algunas plantaciones que tienen el problema de su poca accesibilidad.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Zonificar la dispersión del virus del cardamomo en Guatemala.

2. Analizar la distribución del virus en la planta, para conocer las partes de mayor concentración del virus.

Hipótesis planteadas:

1. La zona productora del norte está libre del patógeno, en contraste con la zona sur, que presenta una infección total de las fincas cultivadoras.

2. Las hojas jóvenes de la planta presentan mayor concentración del virus del mosaico.

II. REVISION DE LITERATURA

A. Cultivo del cardamomo

1. Clasificación botánica. El cardamomo (Elettaria cardamomun Maton), pertenece a la familia Zingiberaceae. Se encuentra en forma silvestre en los bosques monzónicos, siempre-verdes de los Ghats occidentales en el Sur de India y Sri Lanka (19).

a. Características botánicas. El cardamomo es una planta perenne, herbácea, con un rizoma ramificado, del cual surgen varios brotes erectos, con panículas, según la variedad, postradas o erectas. El rizoma es robusto, algo leñoso, en forma horizontal y posee numerosas raíces fibrosas en la copa superficial. Los brotes llegan a un número de 10 a 20 con 2.5 a cinco metros de alto. Están compuestos de hojas nacidas en forma de macollas. Las hojas son de dos láminas, lanceoladas y terminadas en su punta, tienen de 25 a 50 cm de largo y de cinco a 15 cm de ancho; son de color verde oscuro, lisas en el haz y verde pálido en el envés. La superficie inferior puede ser tanto lisa como pubescente, dependiendo de la variedad y la raza (19).

La flor nace en la base de los brotes y llega a una altura de 60 a 120 cm. La inflorescencia es en panícula, erecta,

reclinada o postrada y alargada. Tiene brácteas mediante enrollamiento axilar, usualmente con dos o tres flores hermafroditas, zigimórficas y cerca de cuatro centímetros de largo y 1.7 centímetros de diámetro. La bracteola o bráctea pequeña es tubular como el cáliz, el cual es verde, apenas tridentado y firme. El tubo de la corola es del mismo largo que el del cáliz, con tres lóbulos angostos, frondosos y de color verde pálido. La parte más conspicua de las flores es el labelo ovalado compuesto de tres estambres modificados, de más o menos 1.8 centímetros de largo con punta ovalada. Es blanco con líneas púrpura radiando desde el centro. Hay dos estaminoides rudimentarios separados y un estambre funcional. Este último un pequeño filamento amplio, con una larga antera y una conexión con una pequeña cresta en el ápice. El ovario consiste en tres carpelos unidos con numerosos óvulos en posición axilar y un estilo con un pequeño estigma capitado (19).

Los frutos son cápsulas triloculadas, esféricas, terminadas en punta, de color amarillo o verde claro, de distinto tamaño de acuerdo a la variedad. El fruto contiene de 15 a 20 semillas de color pardo oscuro, rugosas, aromáticas, de más o menos tres milímetros de largo y con una cubierta mucilaginosas. Ellas contienen un perispermo blanco y un pequeño embrión (19).

- b. Citología. Según Darlington y Wylie, el número cromosómico básico de Elettaria es $X=12$, y de

acuerdo con Gregory, el número somático es de $2N=48$ aunque Charkravorti lo menciona como $2N=52$ (3), por lo que existe alguna confusión en cuanto a citología de la planta.

c. Sistemática. Willis (19), argumenta que el género Elettaria tiene siete especies en Indo-Malasia. El cardamomo silvestre y el cultivado es Elettaria cardamomum Maton.

Alguna confusión existe respecto a la sistemática, razas, tipos y grados de Elettaria cardamomum. Las variedades se polinizan entre sí, lo cual ha ayudado a una mayor confusión (3).

De acuerdo con Willis (19), dos variedades botánicas han sido reconocidas con base en el tamaño del fruto. Estas son:

1) Variedad mayor Thwaites. Este es el cardamomo silvestre de la Isla de Marindico Sri Lanka o Ceilán, presente en los bosques húmedos de esa región, el cual es cultivado sólo ocasionalmente. Es una planta robusta de aproximadamente tres metros de alto, con pseudotallos rosados, hojas amplias y panículas erectas. El ovario y el cáliz son subtomentosos. El fruto, es más largo que el de la variedad cardamomum, es alargado, de 2.5 a cinco centímetros de largo, levemente arqueado, de color amarillo verdoso cuando maduro y pardo oscuro al secar, con mayor número de semillas, más largas y menos aromáticas.

2) Variedad cardamomum, sinónimos de la variedad minor. Esta variedad incluye la mayoría de las razas cultivadas. Su altura varía de 2.5 a 5.0 metros. La panícula es larga con flores más numerosas y puede ser postrada, arqueada o recta. El ovario y cáliz son lisos. Los frutos son más pequeños que los de la variedad major y con menos semillas, las que también son más pequeñas y aromáticas. Los frutos se tornan amarillos cuando se secan.

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

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

b) Cardamomo de Mysoure. La planta es de crecimiento robusto, con tallos de hasta cinco metros de altura, con hojas gruesas, largas, las cuales son lisas en la superficie del envés. Las panículas son erectas o arqueadas y los frutos son largos, fusiformes, triangulados y lisos, se desarrollan adecuadamente en altitudes mayores que el cardamomo de Malabar.

En Guatemala se acostumbra asignar diferentes nombres a las líneas que se producen, tales como: cardamomo rojo, amarillo, blanco, grueso, largo, pache, gran cardamomo, etc. Sin embargo, se cree que todas se derivan de las variedades cardamomun y major, de las cuales la primera es la más difundida por ser más productiva y de mayor aceptación en el mercado internacional (2, 19).

En las montañas de Alta Verapaz, se ha reportado la existencia de cardamomo silvestre (11).

Según Amézquita (2), el cardamomo de Malabar y el de Mysore son variedades en contraposición con lo dicho anteriormente.

2. Ecología del cultivo. El cardamomo, se encuentra cultivado en las siguientes zonas de vida:
 - a. Bosques muy húmedos subtropical frío.
 - b. Bosques muy húmedos subtropical cálido.
 - c. Bosques húmedos subtropical templado (2, 12, 15).

Las plantas crecen a diferentes altitudes, tales como de 760 a 1400 metros, respondiendo mejor a las alturas comprendidas entre los 900 y los 1300 metros sobre el nivel del mar.

Requiere de regiones húmedas, con alta precipitación pluvial, bien distribuida durante todo el año. Regiones con precipitaciones mayores a 2000 milímetros anuales, son las apropiadas (2, 3).

La temperatura adecuada es de 10 a 35°C, con una media de 22°C (19).

El cardamomo es muy susceptible a los vientos fuertes (3). La sombra es otro factor importante en el éxito del cultivo, constituye un medio de protección para los rayos directos del sol, fuertes corrientes de viento y mantiene una humedad ambiental (2, 3).

Los suelos aconsejables son los de textura francoarenosa con estructura estable, aunque se cultiva en suelos de textura arcillosa. Todos deben ser ricos en materia orgánica y nutrientes. El cardamomo requiere buen drenaje, no tolera anegamientos (2, 3, 19).

3. Propagación. El cardamomo se propaga en forma sexual y asexual.

a. Sexual. Este método utiliza la siembra por semillas, lo cual lleva a la unión de un óvulo, sistema reproductor femenino y un grano de polen, sistema reproductor masculino. En el presente caso, se conocen las cualidades botánicas de la planta madre, sin conocer las de la planta portadora del polen, debido a la polinización cruzada del cardamomo con la presencia de los insectos polinizadores. Esto lleva a seleccionar la semilla a utilizar en la siembra de cardamomo. Algunas características a utilizar son: tamaño de la semilla, número de granos por semilla, forma y color de la cápsula, etc.

Una ventaja de la reproducción sexual es que el virus del cardamomo no es transmisible en la siembra por semilla y de esta manera se evita la diseminación y entrada del patógeno a las plantaciones.

La siembra por semillas comprende la selección de la semilla, semillero, almácigo, escoger el terreno, trasplante y cuidados culturales (15).

b. Asexual. Este método se realiza por plantación de rizomas, los cuales producirán plantas con las mismas características y cualidades de las plantas madres. La desventaja principal de este método es la transmisión del virus a otras plantaciones, cuando se utiliza plantas portadoras del virus.

El sistema de propagación por rizomas comprende la selección del terreno a emplear, selección de rizomas, plantación y cuidados culturales (15).

El sistema de propagación predominante en la zona norte, es el vegetativo por rizomas en un 67 por ciento; un 22 por ciento se siembra mixto de rizomas y semillas y el once por ciento restante por semillas (15). La zona sur ha cambiado mucho a la siembra por semillas, debido a la diseminación del virus en todas las plantaciones. La semilla se debe manejar adecuadamente para evitar una baja viabilidad de la misma.

El terreno donde se instale el semillero debe ser plano.

Allí se construyen los tablones, cuyas dimensiones más apropiadas son de un metro de ancho por 10 metros de largo, dejando calles de 0.50 metros entre ellos, lo que permite efectuar los trabajos necesarios. Una buena densidad de siembra, se considera de 900 a 1000 semillas por metro cuadrado (2). La germinación se efectúa de ocho a 30 días después de la siembra. Se necesita de la instalación de sombra permanente, procediendo a plantarse en el campo definitivo. Se recomienda practicar dos limpiezas al año, para evitar competencia con malas hierbas (2).

4. Polinización. Las flores son alógamas; aquellas son visitadas por abejas y otros insectos, los cuales efectúan una polinización cruzada (3). Los principales insectos polinizadores en cardamomo son del orden Hymenoptera, pertenecientes a las familias Apidae y Bombidae. Los géneros y especies polinizadores son: Trigona sp, Bombus sp y Apis mellifera. En otras palabras, abejas y abejorros.

5. Importancia económica. Los principales mercados internacionales en la compra-venta de cardamomo son los países árabes, Arabia Saudita, Siria, Irak, Kuwait, Suecia y Noruega (3); además, están los mercados europeos y los de los Estados Unidos de Norte América hacia donde el cardamomo es exportado en oro o en pergamino. La semilla se procesa para la extracción de aceites esenciales, los

cuales se usan en costemología, medicinas, panificación, aromatizantes licores, estimulantes en las funciones gastrointestinales del organismo humano, en la elaboración de algunas salsas, sopas, pescados enlatados y en la aromatización de algunos cigarrillos (2, 3).

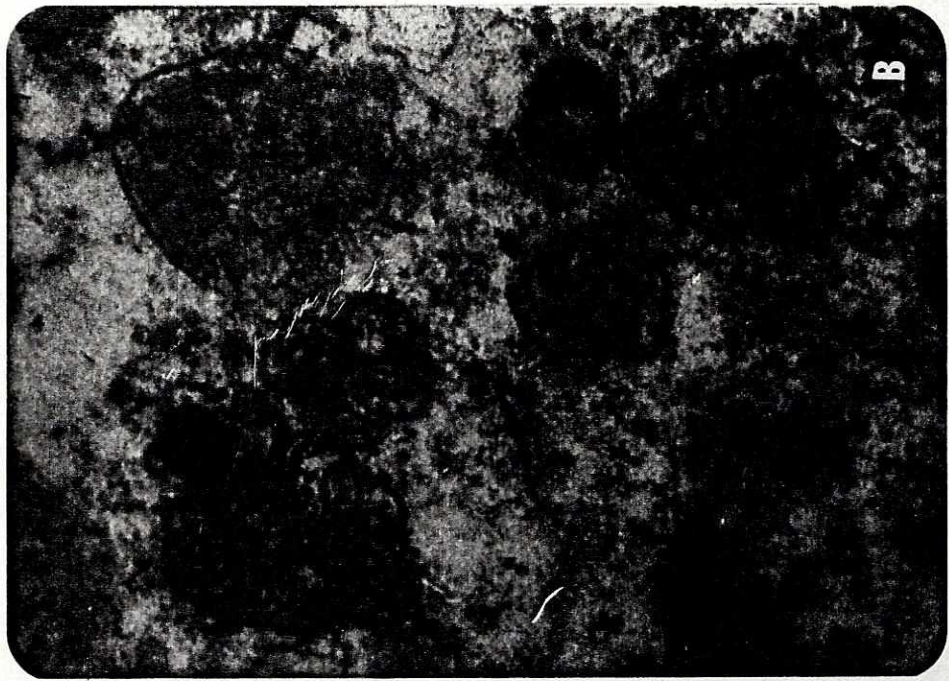
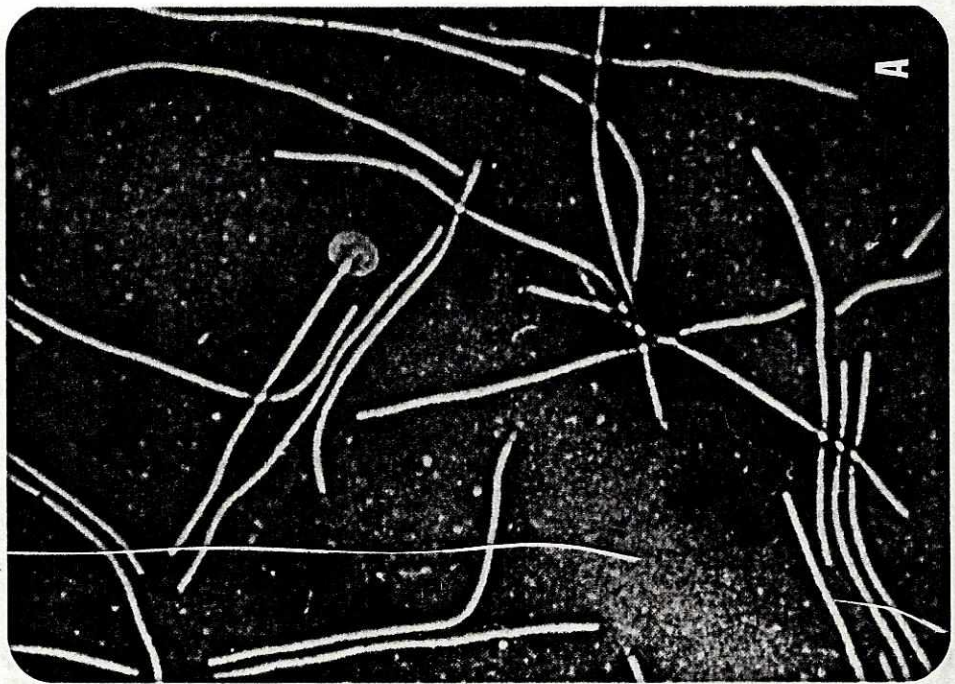
En Guatemala, a partir de 1959, las exportaciones comenzaron a cobrar importancia. En 1978 se exportaron más de 2,000 toneladas métricas, dando un ingreso de 30.8 millones de quetzales. En este país, a la fecha, el cardamomo ocupa el tercer lugar entre los productos de exportación, después del café y el algodón.

B. Virus del mosaico del cardamomo

En Guatemala el virus del mosaico del cardamomo (VMCar) fue detectado en 1975, en fincas del municipio de El Palmar, Quezaltenango. Posteriormente se extendió por todas las plantaciones cardamomeras de la costa sur y en algunas áreas del norte del país. Esta enfermedad ha ocasionado grandes pérdidas, ya que no existe ningún tratamiento preventivo y terapéutico para proteger a las plantas cardamomeras (7, 17).

La enfermedad es producida por el virus del mosaico del cardamomo (VMCar), cuya partícula viral tiene forma de varilla flexible y con un tamaño aproximado de 650 nanómetros, véase Figura 1, página 14 (6).

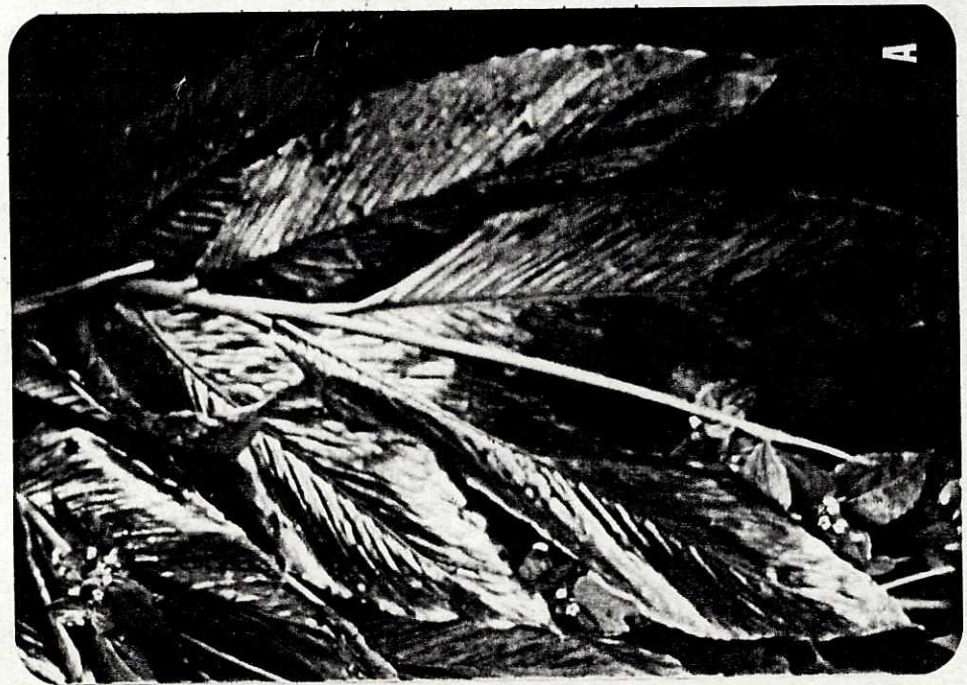
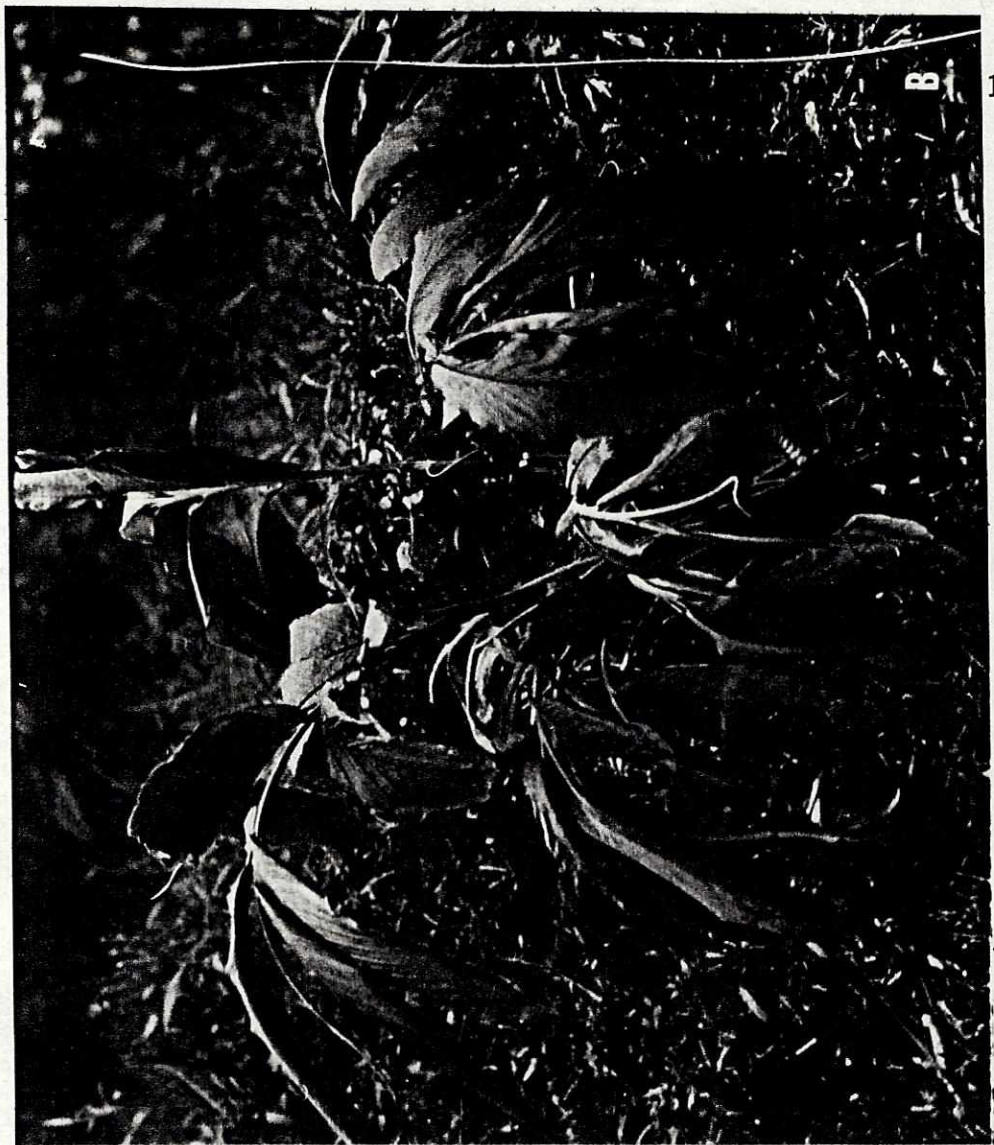
FIG. 1. A. Partículas virales, al microscopio electrónico.
B. Cuerpos de inclusión en el microscopio de luz.



La enfermedad virosa se manifiesta primero en la hojas jóvenes de las partes en crecimiento. La hoja pierde la uniformidad del color verde y se desarrollan fajas o manchas cloróticas, las cuales son agudamente delimitadas. Las manchas crecen gradualmente en tamaño, frecuentemente corriendo juntas y ocupan una gran superficie de la hoja. En hojas con alto grado de infección, las áreas son confinadas sólo entre las venas en franjas alargadas. En casos extremos, la hoja es totalmente clorótica. De las hojas de la región apical, la enfermedad se esparce gradualmente hacia las hojas bajas. Las plantas afectadas lucen cloróticas en comparación con las sanas que son de verde oscuro. Cuando la planta es infectada desde la etapa joven, muestra un achaparramiento y no alcanza su desarrollo normal. Las plantas afectadas se marchitan gradualmente y se vuelven raquílicas, véase Figura 2, página 16. La cosecha y plantación se daña año con año, (6).

El virus se detectó directamente en el áfido Pentalonia nigronervosa y fue catalogado como no persistente. Se demostró la capacidad del áfido para transmitir el VMCar de plantas de cardamomo infectadas a sanas y a otras plantas de la misma familia que se encuentran en áreas cardamomeras (17). En estudios llevados a cabo dentro del Programa "Asociación de Productores de Cardamomo y Universidad del Valle de Guatemala" se han identificado varios hospederos reservorios del

FIG. 2: Síntomas clásicos del VMCar en la planta de cardamomo
A. Mosaico en la lámina de hoja infectada.
B. Raquitismo, achaparramiento y mal desarrollo en planta infectada



virus, los cuales se deben erradicar de las plantaciones de cardamomo (14, 15).

Dentro de las estrategias de control pueden utilizarse:

1. Mantener alejados de la plantación los almácigos creados con material sexual, protegidos con barreras vivas y utilizando prácticas culturales en el control de vectores y malas hierbas.
2. Implementación de resistencia varietal.
3. Evitar contaminación de virus con material infectado a otras zonas.
4. Arranque y quema de material infectado en zonas con poca incidencia de virus, (14).

C. Métodos para detección de virus

1. Microscopio electrónico. El microscopio electrónico es el más usado como herramienta inmediata y accesible para los virologistas en estos días. Desafortunadamente, su costo es elevado. (Véase Figura 1, página 14).

Muchas de las grandes soluciones son obtenibles teóricamente, usando haces de luz de electrones en lugar de luz visible y una moderna transmisión del microscopio electrónico puede resolver de 0.2 a 0.4 nanómetros, el cual es bastante amplio para muchas macromoléculas biológicas.

En un microscopio electrónico, los electrones son producidos en varias direcciones aceleradamente por un alto voltaje y enfocado por un complejo sistema de lentes electrónicos o electromagnéticos. En tales instrumentos, no se pueden utilizar para penetrar especímenes biológicos de más de 200 micrómetros de ancho, usando voltajes acelerados arriba de 100 kilovatios; estos microscopios electrónicos se utilizan mejor para estudiar superficies de sección muy delgada, (8).

2. Microscopio de luz. La técnica utilizada es de cuerpos de inclusión en el microscopio de luz.

Para la realización de esta técnica, la secuencia de pasos es la siguiente: después de lavadas las muestras de hojas u otras, se realizan secciones muy finas de la epidermis y nervadura central de la misma, colocándolas en metil celosolve durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las muestras son transferidas a triton X-100 y luego a una mezcla de agua destilada, calcomine orange y luxol brillante green durante 15 minutos. Las muestras son colocadas en alcohol absoluto por 10 segundos y luego a 2 - methonyethyl acetato durante cinco minutos, para ser montadas en un porta objeto con euparal, protex, meckoglass, practicándose luego las evaluaciones en un microscopio de luz (5).

3. Plantas indicadoras. Muchos tejidos infectados de

virus no muestran síntomas visibles y es necesario recurrir a un sistema más complejo para su detección. Por ejemplo: insectos infectados de virus que comen hojas de trébol causan heridas por picadura o en forma de inyección, no mostrando síntomas visibles. El virus en este caso, debe ser detectado de tres formas: serológicamente, por microscopio electrónico o hacer a los insectos que se alimenten de estas plantas con la probabilidad de tener el virus oculto e inocular plantas indicadoras, que en el caso de presentar el virus, darían síntomas visibles. Similarmente, los virus son transmitidos en suelos por nemátodos y hongos en las raíces de plantas, y los cuales deben ser detectados por inoculación de plantas que llenen este cometido como las plantas indicadoras. Es importante ser cauteloso al interpretar la prueba indirecta de este tipo, porque muchos factores en suma podrían alterar la proporción de las células infectadas inicialmente y modificar o afectar la cantidad de virus detectado (8).

4. Métodos serológicos. Entre las técnicas para estudio de virus, están las basadas en serología. Son muchos los caminos para enseñar la específica combinación entre las partículas de plantas con virus y sus anticuerpos. Los métodos invitro y otros, pueden ser usados cuantitativamente para estimar las concentraciones de antígenos y anticuerpos, pero ellos difieren en conveniencia y sensibilidad.

Muchos tests serológicos se presentan en la formación de

un precipitado cuando el virus antigeno y sus anticuerpos homologos son unidos en presencia de electrólisis. Entre las principales pruebas serológicas, se tienen las siguientes:

- a. de precipitación de tubos
- b. de microprecipitación en placas
- c. de precipitación en porta objetos
- d. de doble difusión en agar
- e. de precipitación de anillo de interfase
- f. de inmunosorbente enzima conjugada (ELISA).

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

Es sabido que los animales contraen enfermedades infecciosas que raramente pueden contraerla otra vez, ya que se vuelven inmunes a éstas. Los anticuerpos creados a un virus son producidos en el animal por células del sistema retículo endotelial, los cuales pueden neutralizar la infección o precipitar a los virus.

Muchas proteínas y polisacáridos pueden actuar como inmunógenos, pero no todos tienen igual capacidad de inmunogenicidad (8).

El agente inmunizador, llamado antigeno o inmunógeno, estimula al animal a desarrollar proteínas llamadas anticuerpos en su suero sanguíneo, las cuales reaccionan específicamente

con el antígeno que estimuló su producción. Para los patólogos, los virus no infectan y no se multiplican en el animal para crear anticuerpos. Por lo que muchos virus son eficientes inmunógenos (8).

Los anticuerpos reaccionan específicamente con su antígeno homólogo, se pueden unir de una sola forma. Las moléculas del anticuerpo tienen sitios activos en su superficie y se cree que son complementarios. Supuestamente en forma molecular, carga e hidrofobicidad a los sitios antigénicos en la superficie de su antígeno homólogo. De tal suerte, que en condiciones adecuadas, ambos pueden combinarse (8).

D. La técnica inmunosorbente enzima conjugada, ELISA
(Enzymelinked immunosorbent assay)

1. Fundamentos de la técnica ELISA. Voller, et al (18) y Clarck & Adams (4) adaptaron esta técnica en detectar virus en plantas.

En este método el virus de la muestra vegetal probada es atrapado selectivamente e inmovilizado por un anticuerpo específico y absorbido a una superficie sólida de una placa de poliestireno. El virus atrapado reacciona con la ayuda de un anticuerpo específico, al cual se le ha enlazado una enzima. Después de lavar la placa, la enzima que ha formado un complejo con el virus atrapado, permite detectarlo colorimétricamente por la adición de un substrato adecuado a la enzima, por hidrólisis da una coloración amarilla (1, 4).

El conjugado anticuerpo-fosfatasa alcalina o enzima, tiene suma importancia. La reacción de condensación se lleva a cabo en los grupos epsilon-amino de la lisina y los grupos alfa-amino terminales de las proteínas reactantes, a través de la formación de una base de Schiff; el glutaraldehído actúa como agente condensante.

Las ventajas particulares de la técnica ELISA sobre otras de anticuerpo-enlazado son: la combinación en la economía de reactivos, la extrema sensibilidad y su potencial de medición. La técnica enzima inmovilizada ha sido reportada como la más sensible en comparación con las técnicas de radio inmovilizadas (1, 4).

2. Clases de la técnica ELISA. La técnica de enzima inmovilizada ha tenido algunas modificaciones, las que han dado origen a distintas clases, las cuales varían en algunas de sus características de detección serológica. Estas clases son:

a. Directo. Es la clase más conocida y de la cual hay suficiente información. Consiste en la adhesión de la gamma-globulina antiviral específica a la placa de poliestireno por un buffer de carbonato de sodio a pH 9.6. A continuación, se colocan las muestras del material a investigar, de manera que si el virus está presente pueda ser atrapado por los anticuerpos y fijados a éstos, por una reacción

antígeno-anticuerpo. Después se adiciona otra gama-globulina conjugada a una enzima, para completar el doble sandwich. Por último, se adiciona el substrato, de tal suerte que si el virus está presente, durante el proceso da una coloración amarilla (4).

Este método tiene la desventaja de que necesita conjugar la enzima a cada antisuero purificado. Además la especificidad de esta prueba es tan alta que puede diferenciar líneas muy relacionadas serológicamente del mismo virus (3).

b. Indirecto. Consiste en la adhesión de las muestras de material en estudio a la placa de poliestireno por un buffer de carbonato de sodio. Si en la muestra existe virus, éste se adhiere a la pared de los pocillos de la placa. Más tarde se coloca la gama-globulina antiviral de conejo, preadsorbida, de manera que se enlaza a los antivirales. Por último, se adiciona el substrato, de forma que si se ha dado origen al complejo virus-antivirus-anticonejo se obtenga una reacción positiva (9).

Esta prueba tiene la ventaja de que no es necesario conjugar específicamente la enzima a cada antígeno a ser probada y elimina la extrema especificidad, permitiendo una evaluación de las relaciones entre las líneas (9).

E. Análisis de las muestras

En algunos casos es difícil considerar infectada una

muestra, ya que el punto a partir del cual debe considerarse la reacción como positiva visualmente, es muy subjetiva. Por lo que se hace necesario recurrir al uso de un análisis fotométrico. Diez (5) toma la media aritmética de la absorbancia a 405 nanómetros, de los controles sin virus más tres desviaciones estándar para la determinación del umbral de infección. Clarck (4) 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. Las muestras con lecturas arriba de 0.150 del control negativo o extracto de planta sana, fueron consideradas como positivas. Otro método utilizado en el trabajo es descontarle a la media de controles negativos el dato de buffer, se multiplica por dos y todas las muestras arriba de este dato son positivas. Se aplicó lo anterior a la metodología a seguir, después de haber utilizado la técnica ELISA en el análisis de las muestras.

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

III. MATERIALES Y METODOS

A. Zonificación del virus del mosaico del cardamomo

Se dividió en dos grandes zonas productoras de cardamomo, bien diferentes en cuanto a: suelo, condiciones climatológicas y extensión, tanto de las plantaciones como del área total sembrada. Otro aspecto importante se refiere a la tecnología aplicada. Las dos grandes zonas son: la zona sur y la zona norte.

1. Muestreo de plantaciones. Se utilizó la metodología de rastreo selectivo-inducido de plantas con posibilidades de ser portadoras del virus. Era imposible utilizar un método estadístico representativo del número de muestras para analizar por área, ya que se necesitaría un número demasiado grande, por lo que se buscó directamente enfocar y buscar plantas portadoras de la virosis.

La recolección de muestras se llevó a cabo de la forma siguiente.

a. Visitas de campo. Se realizaron visitas a fincas y plantaciones cardamomeras en el sur y el norte del país. Se visitaron los municipios de Senahú, Cobán, Chisec, del Departamento de Alta Verapaz. En estas visitas se adquirieron muestras para el análisis respectivo.

La recolección de muestras en la zona sur de Guatemala, estuvo a cargo del extensionista del Programa APROCAR-UVG.

b. Instituciones gubernamentales. La Dirección General de Servicios Agrícolas (DIGESA) del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación y el Banco Nacional de Desarrollo Agrícola (BANDESA) de Guatemala, por medio de sus extensionistas, colaboraron en la recolección de muestras para detectar la virosis.

c. Productores de cardamomo. Se pidió la colaboración de los productores en el envío de muestras para certificar sus plantaciones.

d. Métodos audiovisuales y conferencias. Asimismo, en el Departamento de Alta Verapaz, a través de varias conferencias dictadas en instituciones tales como el Centro Universitario del Norte (CUNOR), la Asociación de Productores de Cardamomo del Norte (APROCAR-NORTE) y la Dirección General de Servicios Agrícolas (DIGESA), se proporcionaron conocimientos sobre el manejo del cardamomo y su virosis. Se solicitó la colaboración de los participantes en la recolección de muestras, manejo y traslado de ellas para su análisis en el Laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala.

2. Manejo y traslado de muestras. Las muestras de

plantas para su análisis debían conservarse en buen estado y bien identificadas. Para ésto, se siguieron las recomendaciones que anotamos a continuación.

- a. Se tomaban una o dos hojas jóvenes de la parte del cogollo de la planta.
- b. Se ponían las hojas en una bolsa pequeña de plástico.
- c. Se cubrían las muestras con un papel húmedo y se cerraba la bolsa plástica.
- d. Debía identificarse cada muestra, llevando un número y llenando una ficha de identificación como la que aparece en la Figura 3, página siguiente. Luego había que colocarlas dentro de una bolsa grande de plástico.
- e. En la parte exterior de la bolsa se debían identificar con el nombre de la finca, aldea, municipio, departamento y lugar de procedencia.
- f. El transporte de las muestras se hacía entre una hielera con el objeto de conservarlas frescas.

B. Distribución del virus del mosaico del cardamomo en plantas infectadas

Para estudiar la distribución del virus en las plantas de cardamomo, se utilizaron varias de ellas completas, con todas

FIGURA 3

Ficha de identificación de muestras para zonificación y diagnóstico del virus del mosaico del cardamomo

PROGRAMA APROCAR-UVG
Asociación de Productores de Cardamomo
Universidad del Valle de Guatemala

Ficha de identificación para zonificación y diagnóstico del virus del mosaico del cardamomo

Número muestra _____ Municipio _____
Nombre finca _____ Aldea _____
Jurisdicción _____ Edad de plantación _____
Departamento _____

Porcentaje de sombra: 25% 50% 75% 100%

sus partes y que presentaban síntomas visibles de portar el virus del mosaico.

Se separaron las plantas en partes principales: hoja del cogollo, hojas jóvenes, hojas intermedias, hojas adultas, hojas bajas, tallo cercano al cogollo, tallo medio, tallo basal, rizoma, raíces, panícula basal, panícula media, puntas de la panícula y semillas frescas.

Se efectuaron ensayos comparativos entre plantas expuestas al sol y plantas que estaban bajo sombra, esto con el fin de estudiar si existen diferencias de concentraciones de virus, ya que las plantas expuestas al sol presentan síntomas más intensos.

C. Reactivos

La aplicación de la técnica ELISA, necesita de los reactivos que enumeramos a continuación.

1. Suero de conejo anti-virus. Este suero es específico para el virus del mosaico del cardamomo. Fue producido por el Doctor Dennis Gonsalves a partir de partículas del VMCar purificadas por él, en la Universidad de Cornell. El virus fue inyectado en forma periódica a conejos, los cuales fueron sangrados a ciertos intervalos, dando como resultado diferentes antisueros.

2. Suero de cabra-anti-conejo. Específico a la

gama-globulina de conejo. Este suero se consigue comercialmente con la denominación de Sigma No. A-8025.

3. Suspensión de secciones de hojas de cardamomo. Fracciones de la hoja son maceradas y extraídas en el buffer de acuerdo al tipo de técnica ELISA a utilizar. Dependiendo de la técnica también se realiza la dilución de las muestras en relación al buffer.

D. Técnica ELISA-indirecta

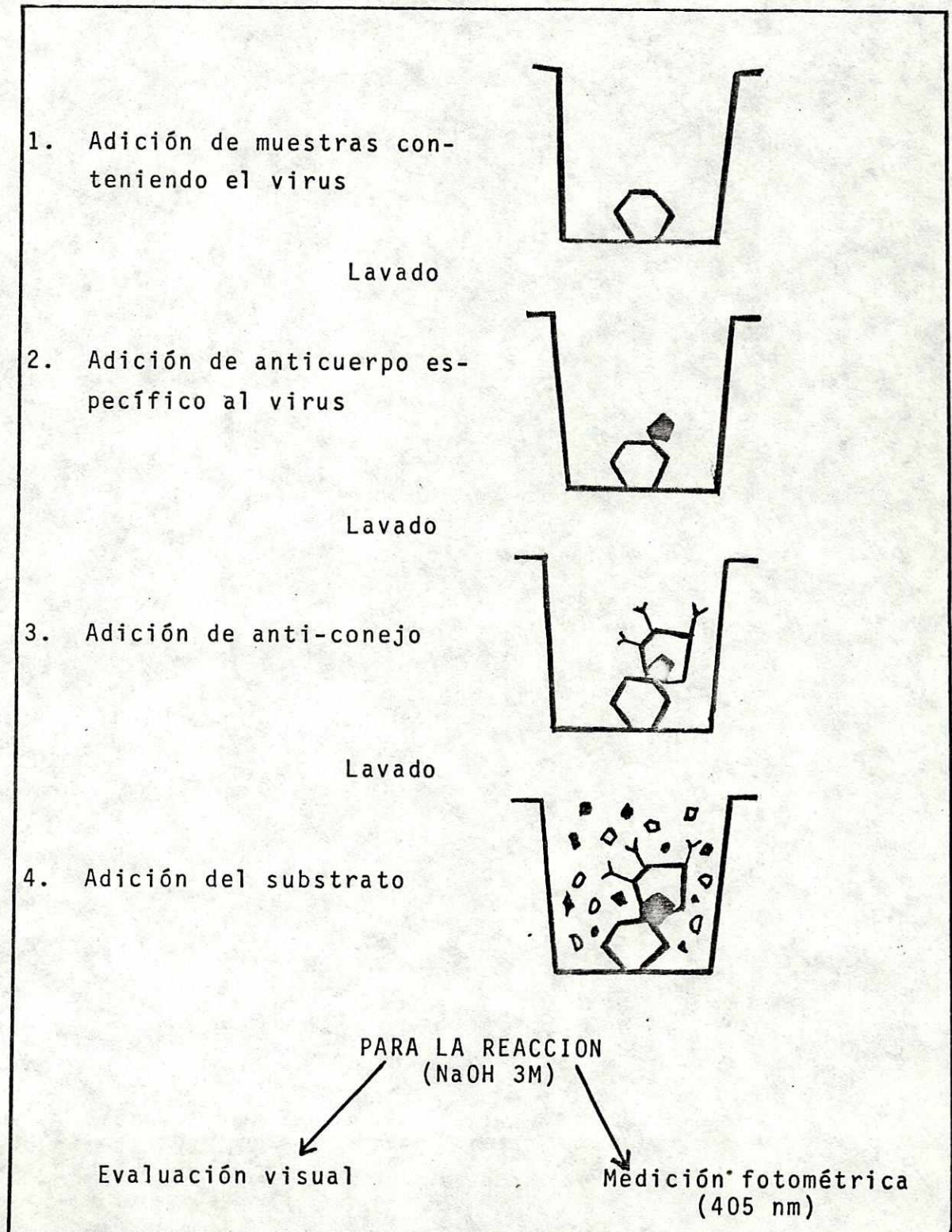
El procedimiento utilizado en el presente trabajo es descrito por Gonsalves (9).

1. Primer paso. Se usa una placa de poliestireno de 96 pocillos a los que se adhieren las muestras. Para ello éstas son extraídas en una solución buffer de carbonato de sodio de pH 0.6, en una relación de dilución de 1:50. Se adicionan 0.20 mililitros por pocillo de las muestras a evaluar (véase Figura 4, página siguiente). Las placas son selladas con papel Parafilm y puestas en cajas de humedad, las que son incubadas durante dos a 2.5 horas a una temperatura de 37°C. Cumplido el tiempo, se lavan tres veces las placas con PBS-Tween, dejando un intervalo de tres minutos entre lavado, antes de enjuagar.

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

FIGURA 4

Principio de la técnica ELISA-indirecta



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

Se llenan los pocillos con alícuotas de 0.20 mililitros de la solución de gama-globulina preadsorbida, Figura 4, página 31. Se incuba de dos a 2.5 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo se lava la placa con PBS-Tween, tres veces, a intervalos de tres minutos.

3. Tercer paso. Se prepara el anti-conejo de cabra, conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Se diluye 1:1000 en buffer de enzima. Se llenan los pocillos con alícuotas de 0.20 mililitros, como se ve en la Figura 4, página 31. Luego se incuba durante dos a 2.5 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo se lava la placa con PBS-Tween, tres veces, a intervalos de tres minutos.

4. Cuarto paso. Se adicionan 0.25 mililitros del sustrato, p-nitrofenil fosfato, diluido en buffer de dietanolamina ajustado a pH 9.8, a razón de un miligramo por mililitro. Se mantiene a temperatura ambiente durante el

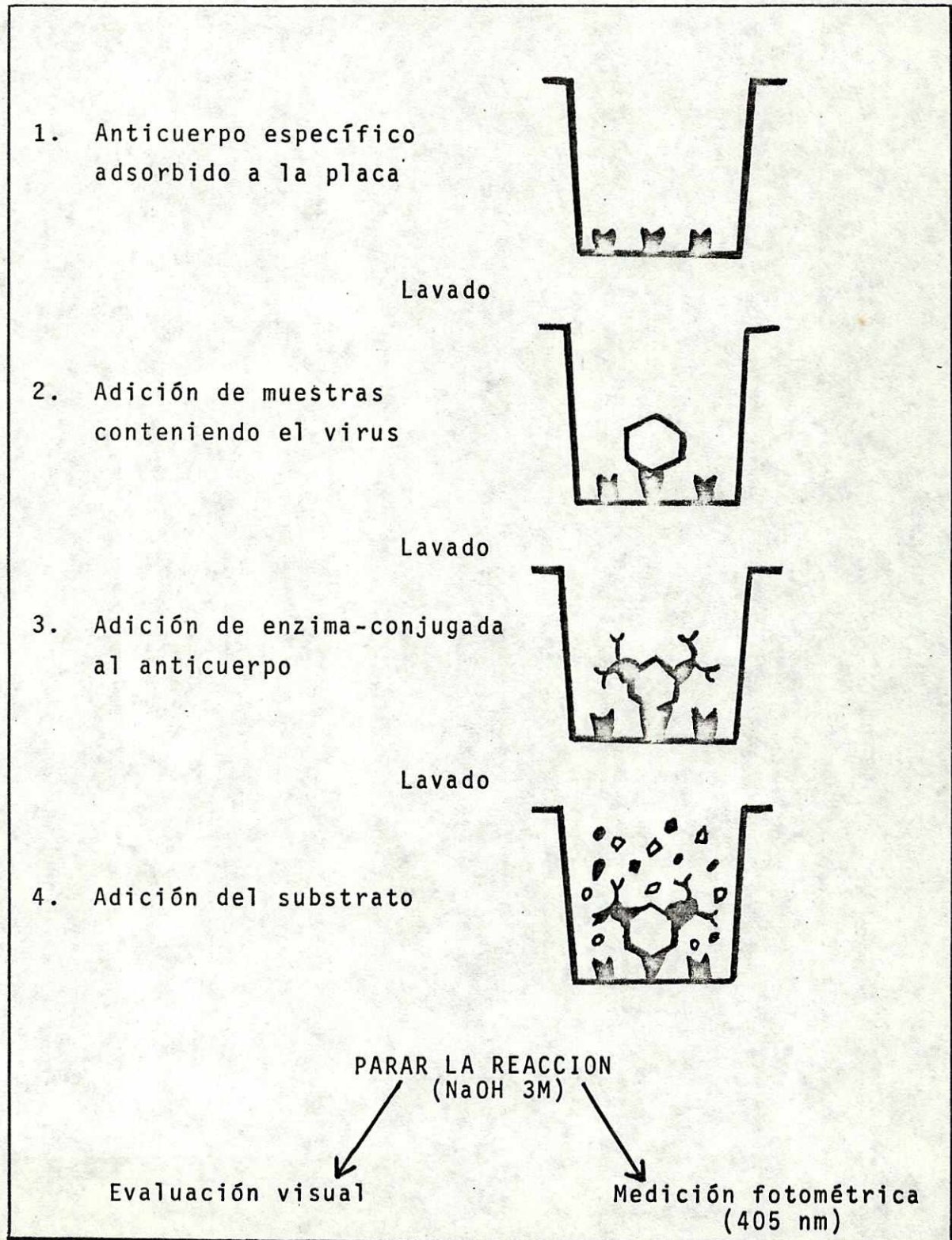
tiempo necesario hasta observar claramente la reacción. En ese momento se detiene la reacción al egresar 0.50 mililitros de hidróxido de sodio 3M a cada pocillo. Luego se evalúa la reacción de la misma forma como se hizo con ELISA-directa, ver Figura 5, página 34.

E. Técnica ELISA-directa

El procedimiento utilizado en el presente trabajo es el descrito por Clarck & Adams (4).

1. Primer paso. Se utiliza una placa de poliestireno de 96 pocillos donde se adhieren los anticuerpos en cada uno de ellos. Para ésto se hace una dilución de la gamma-globulina hasta llevarla a una concentración de cinco microgramos por mililitro en una solución buffer de carbonato de sodio a pH 9.6. Las placas se llenan con 0.20 mililitros por pocillo y luego son selladas con papel Parafilm para evitar alguna contaminación. Luego las placas se incuban en cajas de humedad a 37°C por un período de dos a 2.5 horas. Al cumplirse ese tiempo, se lavan tres veces las placas con buffer salino de fosfatos-Tween PBS-Tween, dejando cada una por un lapso de tres minutos antes de enjuagar. Esto con el propósito de eliminar todos aquellos anticuerpos que no se hallan adherido a las paredes de los pocillos, ver Figura 5, página siguiente.

FIGURA 5
Principio de la técnica ELISA-directa



2. Segundo paso. Utilizando el extracto cruto de las plantas a probar, ver Figura 5, página 34, se procede a llenar tres pocillos con cada muestra, las que pueden ser de 25 a 28 por placa. Los espacios restantes se distribuyen en la placa a mandra de que los controles utilizados queden estratégicamente colocados. Los controles usados son tres: un extracto de planta sana ($K\bar{C}$), uno de planta infectada ($K\bar{C}^+$) y el último con buffer de extracción (B). Cada pocillo se llena con 0.20 mililitros de la suspensión.

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

3. Tercer paso. Cada pocillo vuelve a llenarse con gama-globulina enlazada con fosfatasa alcalina, ver Figura 5, página 34, empleando la concentración más adecuada, cercana a 1:400. A continuación se incuba la placa sellada, dentro de una caja de humedad a una temperatura de 37°C por un período de dos a 2.5 horas. Durante este tiempo si el virus está presente, se completa la reacción denominada

de doble sandwich, es decir, el complejo anticuerpo-virus-anticuerpo conjugado. Transcurrido el tiempo se lava la placa con PBS-Tween, tres veces, dejando un intervalo entre lavadas de tres minutos antes de enjuagar, Figura 3, página 28.

4. Cuarto paso. Se utiliza como substrato pnitrofenil fosfato diluido en un buffer de dietanolamina ajustado a pH 9.8 a razón de un miligramo por mililitro. Se colocan 0.25 mililitros de la dilución por pocillo, asegurándose de que esté recién preparada, Figura 5, página 34. La placa se deja reposar a temperatura ambiente, hasta que se pueda visualizar en forma clara la reacción en aquellos pocillos donde se llevó a cabo el "doble sandwich" durante el proceso. En el momento que se considera que la respuesta es lo suficientemente apreciable se procede a detener la reacción por medio de una solución de hidróxido de sodio (NaOH 3M).

Inmediatamente después de detener la reacción, se hace la lectura de la intensidad de color, al medir la absorbancia a 405 nanómetros. El umbral de infección se calcula sumándole a la media aritmética de los controles negativos tres desviaciones estándar o restando el buffer a toda placa. Se saca el promedio de los controles negativos y todas las muestras arriba del doble de este dato, son positivas.

F. 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 (4).

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 o 60 minutos, a temperatura ambiente. Al transcurrir este tiempo, se centrifuga a 4000 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 entre cada una en 0.5 PBS.

El fraccionamiento de la gama-globulina con DEAE se hace por medio de una columna de intercambio iónico. Para empezar se agita el DEAE disuelto en etanol al 28 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 establece. Se remueve el líquido sobrenadante con una pipeta de Pasteur y se elimina. Se repite el procedimiento 10 veces con agua y tres con 0.5 PBS. Al terminar el lavado, se humedece la columna con 0.5 PBS, asegurándose de que la membrana

quede cubierta. Es recomendable llenar antes el capilar con agua destilada para evitar burbujas. Se coloca el DEAE al mismo tiempo en la columna. Usando una pipeta de Pasteur se lavan hacia abajo todos los lados de la columna con 0.5 PBS, pero llenando hasta donde el DEAE está completamente equilibrado. Se miden el pH y la conductividad en la columna hasta el menisco de DEAE. Se echa cuidadosamente la gama-globulina con una pipeta de Pasteur, sin disturbar el DEAE. Se extraen dos mililitros, uno por tubo. Con esmero se llena la columna de PBS; ésta se mantiene llena todo el tiempo. Para finalizar 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.

G. Conjugación de la enzima con la gama-globulina

Para este proceso se centrifugan 5000 unidades de fosfatasa alcalina, se colocan en un tubo de precipitado, y se desecha el líquido sobrante. El precipitado se disuelve en dos miligramos de gama-globulina purificada. Se dializa tres veces en contra de PBS. Se le adiciona glutaraldehído en solución acuosa, mezclándolo bien, hasta 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.

Finalmente, se le adiciona albúmina de huevo para llevarla a una concentración de cinco miligramos por mililitro y se guarda en refrigeración a 4°C por tiempo indefinido, en tubos previamente siliconados.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

En este capítulo se presentan los resultados del presente trabajo de investigación, haciendo al mismo tiempo la discusión de los mismos. Dichos resultados se presentan en el siguiente orden:

En primer término se trata sobre la distribución del virus del mosaico del cardamomo en la planta, para lo cual se estudiaron las partes de la misma con el objeto de determinar el lugar de las mayores concentraciones del patógeno y de este modo poder trabajar con ellas como fuente fidedigna en el análisis del virus.

En segundo término se presentan los resultados de la zonificación del virus del mosaico del cardamomo en Guatemala.

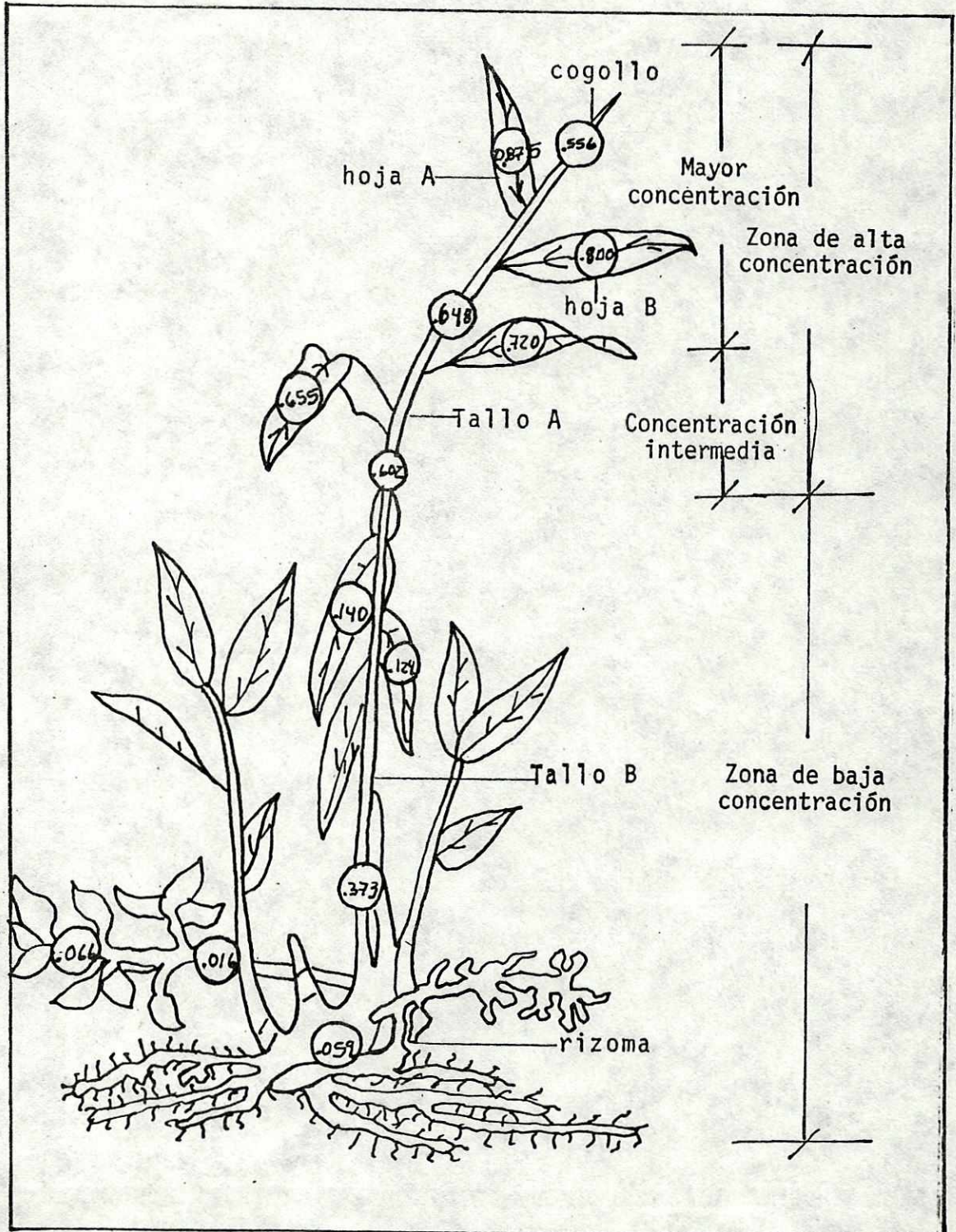
A. Distribución del virus en la planta

El estudio de la distribución del virus en la planta se hizo con el fin de conocer las áreas de la misma con mayores concentraciones de virus, previa recolección de muestras de las áreas. Esto tuvo como propósito contar con un análisis exacto de las plantas portadoras del virus.

La Figura 6, página siguiente, muestra las partes de la planta con mayor concentración de virus. Esta se da en las

FIGURA 6

Datos de la distribución de virus en la planta



dos primeras hojas jóvenes, hoja del cogollo y hojas de retoños. De allí es que se recomienda utilizarlas para conseguir mejores resultados y detectar el virus con mayor probabilidad.

La planta se dividió en dos zonas: la de alta y baja concentración. La zona de alta concentración se subdividió en zona de mayor concentración, la que abarca las dos primeras hojas jóvenes y la hoja del cogollo, y la zona de concentración intermedia que abarca las hojas de mediano crecimiento y a las adultas. Estas poseen una menor concentración de virus que las hojas jóvenes; pero al mismo tiempo, mayor concentración de virus que las hojas basales que pertenecen a la zona de baja concentración. Rizoma, raíz, tallo adulto, hojas basales y bandolas, pertenecen a la zona de baja concentración en la planta. Esto no significa que no sean partes portadoras del virus cuando se plantan rizomas infectados de virus. Estas plantas crecerán raquílicas, achaparradas y nunca llegarán a representar una producción económicamente rentable. Por lo tanto, se recomienda utilizar reproducción por semilla en zonas de alta incidencia del virus, ya que de esta forma no existe transmisión alguna del patógeno. Los datos anteriormente descritos se presentan en la Figura 6, página anterior.

Usualmente, la intensidad de la reacción se correlaciona con la severidad de la infección. Es decir, mientras más se

FIGURA 7

Comparación de la distribución del "VMCar" en plantas al sol y a la sombra, para las distintas partes de la planta*

Partes de la planta	Lectura		Promedio de 10 plantas de cada una analizada a 405 nanómetros
	Planta al sol	Planta a la sombra	
Hoja A	1.531	0.728	
Hoja B	1.416	0.603	
Cogollo	1.832	0.524	
Tallo A	1.044	.402	
Tallo B	0.390	0.152	
Rizoma	0.065	0.041	

* Véase Figura 6, página 42.

manifiesten los síntomas de infección con el VMCar en las plantas, más intensa es la reacción y más altas serán las lecturas cuantitativas de absorbancia en el espectrofotómetro.

En este trabajo pudo demostrarse que la zona sur presenta mayores concentraciones de virus en las plantas, comparadas éstas con las de la zona norte. Esto posiblemente se deba a la diferencia que en cuanto a las condiciones climatológicas existe entre ambas zonas.

Asimismo se puso observar que es usual que las plantas infectadas con el VMCar que están expuestas al sol, manifiestan síntomas más severos que las plantas de cardamomo que son manejadas bajo sombra. Se trabajaron plantas tanto de sol como de sombra, con el objeto de constatar la veracidad de esta comparación, dando como resultado la comprobación de que las plantas expuestas al sol presentan mayores concentraciones de virus y que en las plantas manejadas con sombra, el patógeno se inhibe o se oculta un poco. (Véase Figura 7, página 44).

El VMCar se encontró en todas las partes de la planta: hojas, tallo, rizoma, raíz, hijos, bandolas y frutos, como lo demuestra la Figura 4, página 31. Lo que varía es la distribución del virus del mosaico del cardamomo, tanto dentro de la misma planta, como entre distintas plantas.

B. Zonificación en Guatemala del virus del mosaico del cardamomo

Los resultados directos del trabajo de zonificación del virus del mosaico del cardamomo, aplicando la técnica inmunológica ELISA a las muestras recolectadas, se detallan para la zona norte en el Cuadro 1 y Figura 8 (véase páginas 47 y 54). Para la zona sur (o costa sur) en el Cuadro 2 y Figura 8 (véase páginas 52 y 54).

En la zona norte se detectaron siete focos de infección, dentro de los cuales los más importantes son los del Valle del Ticarío y San Simón, que presentan en sus plantaciones bastante diseminado y arraigado el virus. Los otros cuatro focos de infección son pequeños, pero se deben tomar las precauciones del caso. En lo que respecta a esta zona, debe seguirse muestreando, ya que debido a la poca accesibilidad de algunas de sus plantaciones y al total del área cultivada en ella, ésto se hace necesario.

En la costa sur, el 100 por ciento de fincas productoras presentan problemas de virus, pero aplican mejor tecnología a sus plantaciones, por lo que obtienen mayores producciones. Los datos anteriores se detallan en los cuadros 1 y 2 y Figura 8.

CUADRO 1

Resultados de las muestras de cardamomo analizadas sobre VMCar
en la zona norte de Guatemala

No. muestras analizadas	Lugar de procedencia	Municipio	Departamento	Resultados
3	Tuilhá	Senahú	Alta Verapaz	negativos
33	Volcán	Senahú	Alta Verapaz	negativos
5	Chipimech	Senahú	Alta Verapaz	negativos
5	Satsabal	Senahú	Alta Verapaz	negativos
8	Cunor	Cobán	Alta Verapaz	negativos
2	Tulche	Cobán	Alta Verapaz	negativos
3	Tolich	Cobán	Alta Verapaz	negativos
4	Chobal	Cobán	Alta Verapaz	negativos
1	Villa Victoria	Cobán	Alta Verapaz	negativos
2	Bilitum	Cobán	Alta Verapaz	negativos
18	Santo Tomás Purahú	Cobán	Alta Verapaz	negativos 78% positivos 22%

Continúa Cuadro 1

No. muestras analizadas	Lugar de procedencia	Municipio	Departamento	Resultados
1	Sachicha	Cobán	Alta Verapaz	negativos
5	Sorté	Cobán	Alta Verapaz	negativos
2	Chajmacan	Cobán	Alta Verapaz	negativos
1	Cubiltutz	Cobán	Alta Verapaz	negativos
1	Dolores	Cobán	Alta Verapaz	negativos
1	Chinamox	Cobán	Alta Verapaz	negativos
2	Secojpur	Cobán	Alta Verapaz	negativos
3	Spalau	Cobán	Alta Verapaz	negativos
2	Sibecte	Cobán	Alta Verapaz	negativos
5	Rosario	Cobán	Alta Verapaz	negativos positivos 80% 20%
5	Saabas	Cobán	Alta Verapaz	negativos positivos 40% 60%
3	Batbaltzul	Cobán	Alta Verapaz	negativos
4	Bella Vista	San Cristóbal	Alta Verapaz	negativos
2	Provincia	San Cristóbal	Alta Verapaz	negativos

Continúa Cuadro 1

No. muestras analizadas	Lugar de procedencia	Municipio	Departamento	Resultados
1	San Cristóbal	San Cristóbal	Alta Verapaz	negativos
2	Aldea Queja	San Cristóbal	Alta Verapaz	negativos
1	Santa Elena	San Cristóbal	Alta Verapaz	negativos
1	Valeu	San Cristóbal	Alta Verapaz	negativos
1	Aquil	San Cristóbal	Alta Verapaz	negativos
1	Chiyuc	San Cristóbal	Alta Verapaz	negativos
6	Tanchí	Carchá	Alta Verapaz	negativos
7	Pekixol	Carchá	Alta Verapaz	negativos
12	Chichaib	Carchá	Alta Verapaz	negativos
1	Sacbinal	Carchá	Alta Verapaz	negativos
2	Caquigual	Carchá	Alta Verapaz	negativos
12	Ichab	Carchá	Alta Verapaz	negativos
10	Chimó	Carchá	Alta Verapaz	negativos
2	Campur	Carchá	Alta Verapaz	negativos
3	Sesuc	Carchá	Alta Verapaz	negativos

Continúa Cuadro 1

No. muest- ras ana- lizadas	Lugar de procedencia	Municipio	Departamento	Resultados
1	Pajal	Carchá	Alta Verapaz	negativos
12	Chiyo	Carchá	Alta Verapaz	negativos
1	Sacayou	Carchá	Alta Verapaz	negativos
5	Cojal	Carchá	Alta Verapaz	negativos
3	Chelac	Carchá	Alta Verapaz	negativos
5	Quixal	Carchá	Alta Verapaz	negativos
5	Cojaj	Carchá	Alta Verapaz	negativos
20	Caquiton	Carchá	Alta Verapaz	negativos
3	Rubelchoc-Campur	Carchá	Alta Verapaz	negativos
5	Sequiccne	Carchá	Alta Verapaz	negativos
2	Secuabon	Carchá	Alta Verapaz	negativos
2	Chantacá	Carchá	Alta Verapaz	negativos
5	Pocola	Carchá	Alta Verapaz	negativos
4	Chicoj1	Carchá	Alta Verapaz	negativos
3	Chiqueleb	Carchá	Alta Verapaz	negativos

Continúa Cuadro 1

No. muestras analizadas	Lugar de procedencia	Municipio	Departamento	Resultados
4	Bankab	Carchá	Alta Verapaz	negativos
8	Tomtem	Carchá	Alta Verapaz	negativos
3	Muyha	Carchá	Alta Verapaz	negativos
63	Samococh Valle del Ticarío	Chisec	Alta Verapaz	negativos positivos 28.5% 71.5%
3	Trece Aguas	Chisec	Alta Verapaz	negativos
2	Chisec	Chisec	Alta Verapaz	negativos
1	Pecajbá	Chisec	Alta Verapaz	negativos
2	Chacsel	Chisec	Alta Verapaz	negativos
18	Chaquipur	Chisec	Alta Verapaz	negativos negativos positivos 72% 28%
1	Oxib Pec	Chisec	Alta Verapaz	negativos
17	San Simón	Chisec	Alta Verapaz	negativos positivos 41% 59%
63	Playa Grande	San Miguel Uspantán	Quiché	negativos positivos 95% 5%
72	Chunacté Chocor nacional almacigo	Izabal	Izabal	negativos

CUADRO 2

Resultados de las muestras de cardamomo analizadas sobre VMCar en la zona sur de Guatemala

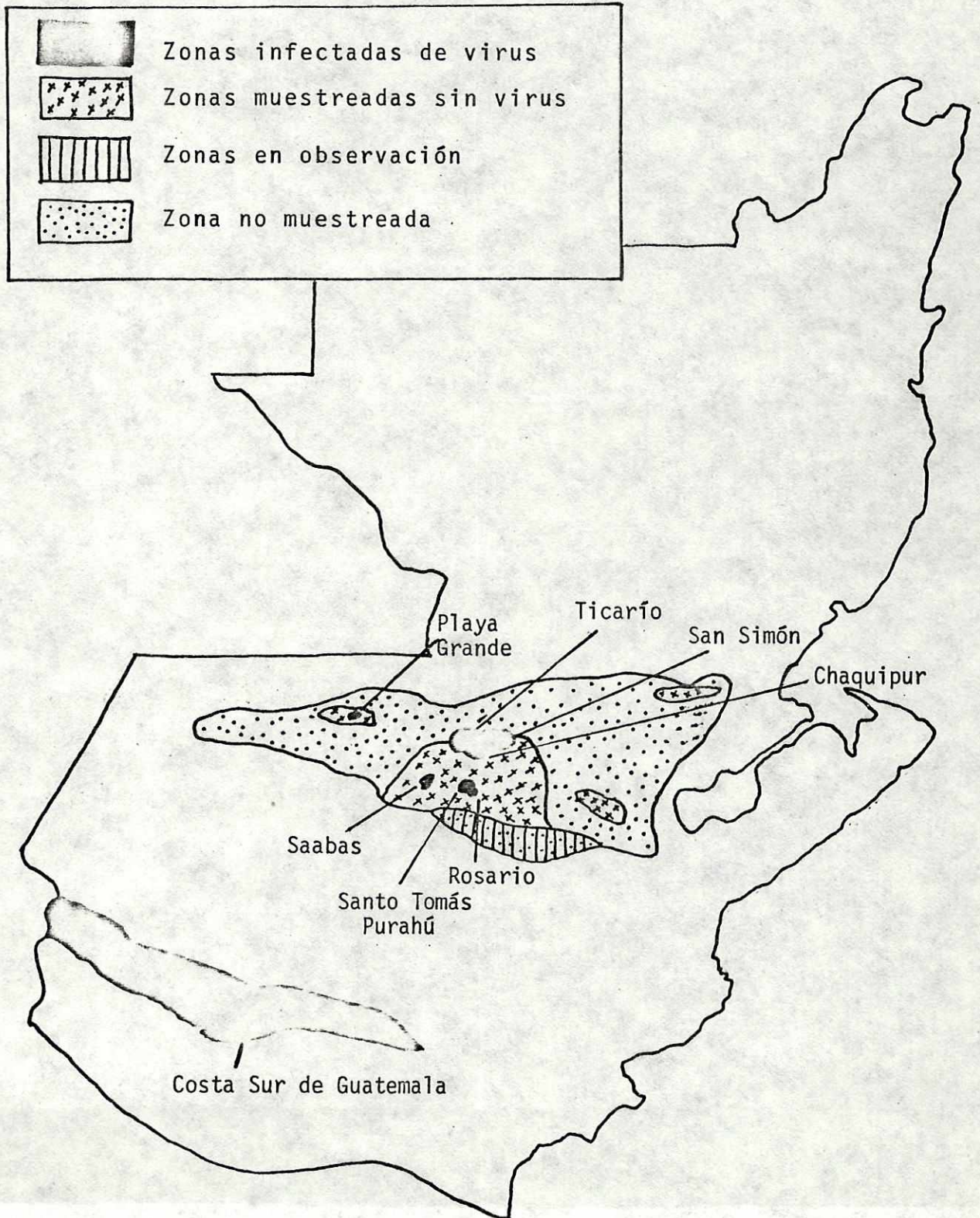
Fincas	Municipio	Departamento	Resultados
Acacias	Nueva Concepción	Escuintla	negativa
Argentina	Reforma	San Marcos	alta incidencia
Armonías	Chicacao	Suchitepéquez	alta incidencia
Altamira	San Francisco Zapotitlán	Suchitepéquez	alta incidencia
Asturias	San Francisco Zapotitlán	Suchitepéquez	alta incidencia
Culpán	Colomba	Quezaltenango	alta incidencia
Dolores	Azintal	Retalhuleu	alta incidencia
Igualdad	Reforma	San Marcos	alta incidencia
Monte de oro	Santiago Atitlán	Sololá	alta incidencia
Margaritas	San Francisco Zapotitlán	Suchitepéquez	alta incidencia
Patzolin	Palmar	Quezaltenango	alta incidencia
Porvenir	Chicacao	Suchitepéquez	alta incidencia

Continúa Cuadro 2

Fincas	Municipio	Departamento	Resultados
Rosario	Palmar	Quezaltenango	alta incidencia
Santa Augustina	Nuevo San Carlos	Retalhuleu	alta incidencia
Santa Adelaida	Santa Bárbara	Suchitepéquez	alta incidencia
Armenia Lorena	San Rafael Pie de 1a Cuesta	San Marcos	alta incidencia
Las Neblinas	San Pablo	San Marcos	alta incidencia
La Viña	Colomba	Quezaltenango	alta incidencia
Portaceli	Colomba	Quezaltenango	alta incidencia
Edén	San Pablo	San Marcos	alta incidencia
Naranja	Chicacao	Suchitepéquez	alta incidencia
Nueva Florecia	Colomba	Quezaltenango	alta incidencia
Providencia	San Martín	Quezaltenango	alta incidencia
Pampojila	San Lucas Tolimán	Sololá	alta incidencia
Verapaz	Colomba	Quezaltenango	alta incidencia
Siglesias	San Carlos	Escuintla	alta incidencia
Nueva Margarita	Reforma	San Marcos	alta incidencia

FIGURA 8

Zonificación del virus del mosaico en cardamomo



El trabajo adquiere mayor importancia en cuanto a la zonificación del virus del mosaico en cardamomo (VMCar) de la zona norte, ya que señala focos dispersos de infección que, de tomarse las medidas necesarias, haría posible que en dichos focos pueda controlarse y erradicarse el virus. Al darle la importancia que su control requiere, podrían aislarse los focos de infección y en esta forma, evitar el traslado de rizomas infectados a otras plantaciones libres de virus, ya que ésta es una de las formas de fácil propagación. Al sembrar plantas de cardamomo a partir de rizomas infectados, éstas crecerán raquíticas, enanas, con tallos postrados, cloróticas y nunca se obtendrá rentabilidad del cultivo. En lugares que presenten incidencia de virus debe recurrirse a la siembra por semillas, utilizando barreras artificiales y tratando de retardar al máximo la entrada del virus a las plantaciones.

Otro aspecto importante en el uso de semilleros y almácigos, es la existencia de plantas portadoras del virus, que no presentan síntomas visibles, por lo que podrían darse contaminaciones de virus por este medio.

El virus del mosaico del cardamomo está causando daño, tanto a la economía nacional, como a los productores, ya que puede bajar ostensiblemente la producción, llegando en algunos casos esta baja hasta un 70 por ciento. Es de hacer notar el impacto económico que tendría la propagación del VMCar

en la zona norte, en donde el 80 por ciento de la producción está en poder de pequeños productores, los que cultivan hasta una manzana, con tecnología inapropiada y sin conocimientos acerca del virus. El total de pequeños productores es de aproximadamente 42,000 agricultores. Un 17 por ciento del total de productores de la zona norte cultivan hasta 45 hectáreas (una caballería), y el restante tres por ciento cultiva más de esa extensión.

La producción promedio en la zona norte es de 26 Kg/ha (0.5 quintales por manzana) de cardamomo pergamino, en contraste con la zona sur con plantaciones extensas, y con aplicación de una tecnología apropiada. Además, por la diversificación de cultivos y producciones que oscilan entre 240 a 690 Kg por hectárea (cinco a 15 quintales) de cardamomo pergamino por manzana, las cuales pueden convivir y subsistir con el virus arraigado en sus plantaciones.

En la zona norte la cantidad de áfidos es muy poca, por lo que la contaminación y difusión del virus está dada por las manos del hombre al trasladar material infectado tanto de la costa sur a la zona norte, como de los focos de infección en el norte a zonas libres de virus.

Debido al alza de precios de exportación alcanzada por este producto en 1984, tanto pequeños como medianos y grandes productores, están cultivando cardamomo, sin tomar en

cuenta que los proveedores de rizomas no proporcionan los mejores materiales; por el contrario, dan materiales raquí-
ticos y en algunos casos portadores de virus. Un caso típico es el traslado de rizomas del Valle del Ticario a otros municipios como Tukurú, el cual está en observación.

El mayor problema que tuvo que afrontarse mientras se llevaba a cabo el trabajo de zonificación, fue lo difícil de la recolección y traslado de muestras al laboratorio para su análisis. Esto se debió a la poca accesibilidad que hay hacia muchas de las plantaciones, así como al poco interés de algunos agricultores e instituciones.

Es necesario hacer notar que de no tomarse las medidas pertinentes para la erradicación del virus de la zona norte, ésta tendrá que aprender a convivir con él como lo ha tenido que hacerlo la zona sur del país. Instituciones del sector público agrícola, tales como el Departamento de Sanidad Vegetal de la Dirección de Servicios Agrícolas (DIGESA), puede y debería crear dentro de sus objetivos, medidas para erradicar y controlar el virus del mosaico del cardamomo.

Lo anteriormente expuesto se basa en que no existe control químico ni terapéutico alguno para tratamiento de enfermedades virosas en plantas, la única forma de combatir la enfermedad es por medio de estrategias de control.

Por su amplia sensibilidad a la detección de razas de

virus, se utilizó la técnica ELISA-indirecta. Como específica al virus del mosaico del cardamomo se empleó la técnica ELISA-directa. La primera detectaría otras razas de virus del mosaico, dadas por posibles mutaciones del patógeno. La técnica directa sería negativa, y no detectaría la existencia de otras razas de virus.

Creemos que el presente trabajo debe continuarse por las siguientes razones:

1. El constante movimiento del virus infectando a otras plantaciones, tanto por medio de vectores, huéspedes alternos y movimiento físico del patógeno, como por traslado de material infectado.
2. Entre mayor sea el número de muestras analizadas, mayor conocimiento se tendrá sobre los lugares infectados y los no infectados.
3. Existe poca accesibilidad a algunas plantaciones.

V. CONCLUSIONES

El virus del mosaico del cardamomo tiene una distribución irregular en las plantas infectadas, sin embargo y de acuerdo con los resultados de la presente investigación, podemos decir que se probó que las mayores concentraciones del virus se encuentran en las hojas jóvenes; hoja del cogollo, y retoños de la planta, más que en el resto de la misma.

Asimismo que las plantas expuestas al sol presentan una mayor concentración de virus que las que se cultivan bajo sombra.

La concentración de virus en la planta, se da en mayores proporciones en la zona sur que en la zona norte del país.

Los rizomas plantados de plantas portadoras de virus, aunque presentan una baja concentración de virus, producen y desarrollan el patógeno.

El virus está presente en todas las plantaciones de la zona sur y en siete focos de infección en la zona norte. En ésta última, se deben tomar medidas de erradicación del virus por instituciones creadas con tal fin, como Sanidad Vegetal; de lo contrario, se deberá aprender a convivir con dicho patógeno.

El virus está causando baja de producción y por ende afecta la economía tanto nacional como particular de cada productor.

Las principales estrategias de control se basan primordialmente en: la erradicación de plantas infectadas; en no emplear material asexual infectado; aislar la plantación; vigilar e inspeccionar la misma; controlar los hospederos reservorios y áfidos, sin dañar insectos polinizadores, y, finalmente, formar almácigos con previo semillero.

BIBLIOGRAFIA

1. Amato, S.A. et al. "El ensayo inmunoabsorbente enzima conjugada (ELISA) en el diagnóstico de rotavirus". Rev. Med. Hosp. Nac. Niños 12(2). 1977. pp. 73-78.
2. Amézquita, M.O. Técnicas de producción utilizadas en el cultivo del cardamomo (Elettaria cardamomun), según tamaño de explotación agrícola en Alta Verapaz. Tesis de Ing. Agr., Guatemala, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1978.
3. Bonilla, O. Búsqueda de fuentes de resistencia y métodos de diagnóstico al virus del mosaico en cardamomo. Tesis de Ing. Agr., Guatemala, Departamento de Ciencias Agrícolas, Universidad del Valle de Guatemala, 1983, 66 p.
4. Clarck, M.F. y A.N. Adams. "Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses." J. Gen. Virol. 34: 475-483. 1977.
5. Diez, M. Diagnóstico del virus del mosaico del cardamomo utilizando la técnica enzima conjugada (ELISA). Tesis de Ing. Agr., Guatemala, Departamento de Ciencias Agrícolas, Universidad del Valle de Guatemala. 1982, 50 p.
6. Dimitman, J. "An aphid transmitted viruses of cardamom on Guatemala." Phytopathology Abstracts 71: 104. 1981.
7. Flores, M.D. El mosaico del cardamomo. La Cámara del Agro de Guatemala, C.A. 1980.
8. Gibbs, A. y B. Harrison. "Plant Virology". Edward Arnold. 33, 89-100, 124-182. 1976.
9. Gonsalves, D. Indirect ELISA for cardamom mosaic virus. Laboratory notes. New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University. New York. 1982.
10. González, E. Cultivo del cardamomo. Ministerio de Agricultura, Guatemala, C.A. 1977. 16 p.

11. Guatemala, Banco de. Informe económico. Abril-septiembre 1979. Guatemala, C.A. 1979. 68 p.
12. Holdridge. Clasificación de zonas de vida en Guatemala a nivel de reconocimiento.
13. Hartmann, H.T. y D.E. Kester. Propagación de plantas. CECSA. Séptima impresión. México, 1979. 810 p.
14. Memorias. Asociación de Productores de Cardamomo-Universidad del Valle de Guatemala. 1983-1984.
15. Memorias. II Seminario sobre el cultivo del cardamomo. Cobán, Alta Verapaz. Guatemala. 1983.
16. Overdick, F.J. El cultivo y beneficio práctico del cardamomo. Tesis Escuela de Agricultura Bárcena, Villa Nueva. Guatemala, C. A. 1960.
17. Resúmenes. II Congreso de manejo integrado de plagas. Guatemala, C.A. 31-34. 1984.
18. Voller, A., et al. "The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." J. Gen. Vir. 33: 165-167. 1976.
19. Willis, J.C. A dictionary of the flowering plants and ferns. 7th Ed. (Rev. by h.k. Airey Shaw). Cambridge Univ. Press. 1966.