

AISLAMIENTO DEL AGENTE CAUSANTE DE LA MANCHA

FOLIAR DEL CARDAMOMO

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Ciencias Agrícolas

AISLAMIENTO DEL AGENTE CAUSANTE DE LA MANCHA

FOLIAR DEL CARDAMOMO

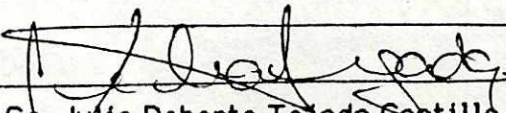
SABRINA CASTILLO GALLUSSER

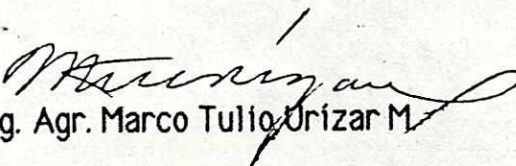
Trabajo de investigación presentado para optar
el título de Ingeniero Agrónomo en el grado aca-
démico de Licenciado en Ciencias Agrícolas

Guatemala
1985

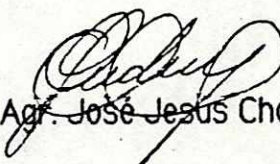
a Gladys

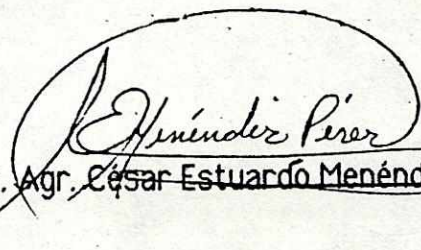
Vo. Bo.

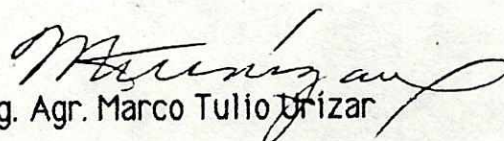
(f) 
Ms.Sc. Julio Roberto Tejada Castillo
Asesor

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

Tribunal:

(f) 
Ing. Agr. José Jesús Chonay

(f) 
Ing. Agr. César Estuardo Menéndez

(f) 
Ing. Agr. Marco Tulio Urizar

Fecha de aprobación: 12/VIII/85

AGRADECIMIENTO

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

Universidad del Valle de Guatemala

Asociación de Productores de Cardamomo

Las siguientes personas: Julio Tejada, Marco Tulio Urizar, Rolando Mejía, Iván Azurdía y Sandra Castillo.

Mis compañeros de trabajo, especialmente a Rígoberto Castañeda.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
A. Cultivo del cardamomo	3
1. Características botánicas	3
a. Estructura	3
b. Polinización	4
c. Sistemática	4
2. Ecología del cultivo	5
3. Importancia económica	5
B. Bacterias fitopatógenas	6
1. Características	6
a. Morfología	6
b. Reproducción	7
c. Ecología y diseminación	7
d. Clasificación e identificación	7

	Página
C. Manchas foliares	9
1. Manchas foliares en el cardamomo	10
a. Causadas por bacterias	10
b. Causadas por hongos	11
D. Diagnósis	12
1. Aislamiento	15
a. Medios de cultivo	15
b. Cultivos	16
2. Inoculación	16
3. Incubación	16
III. MATERIALES Y METODO	18
A. Localización del área experimental	18
B. Materiales empleados	18
C. Diseño experimental	31
D. Manejo del experimento	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	32
V. CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFIA	

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Enfermedades más comunes del cardamomo en Guatemala según DIGESA	13
2	Enfermedades más comunes del cardamomo en Guatemala según el Instituto Técnico de Capacitación y Productividad	14
3	Características de las bacterias aisladas en medios puros a nivel de laboratorio	33

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema general para el aislamiento del organismo causante de la mancha foliar	19
2	Preparación de medios nutritivos para cajas petri	22
3	Preparación de medios nutritivos para tubos	23
4	Métodos para hacer cultivos	24
5	Aislamiento de colonias a cultivos puros	26
6	Preparación de inóculo a partir de cultivos de bacterias	27
7	Preparación de inóculo a partir de mancha foliar	29
8	Esquema general de métodos de inoculación e incubación	30

RESUMEN

La mancha foliar del cardamomo es una enfermedad que se encuentra en la mayoría de las plantaciones cardamomeras del país. La mancha se inicia como un punto amarillo que crece hasta tornarse en una mancha pardo claro con el centro oscuro y un halo clorótico que la rodea. El objetivo de este trabajo fue aislar el agente causante de la enfermedad.

Alguna bibliografía nacional refiere a la enfermedad como "Cercóspora" pero debido al halo clorótico característico de manchas bacterianas, ausencia de signos de hongo en las muestras estudiadas y la temperatura que propicia el desarrollo de la enfermedad, se considera que el agente causante no es un hongo sino una bacteria.

Se hicieron cámaras de humedad para esporulación, así mismo, se realizaron cultivos en distintos agares tanto en medios aeróbicos como anaeróbicos. En todos los medios aeróbicos se obtuvo la misma bacteria gram negativo, de olor desagradable, color crema-no fluorescente (llamada clave). Esta bacteria y otras bacterias obtenidas se inocularon separada e individualmente en plantas sanas de nueve meses de edad. También se inoculó la mancha directamente. Para inocular se utilizaron los métodos de asperjado, inyectado, agujereado, cortado y frotado, siendo el método de agujereado el más rápido y práctico. Luego de la inoculación las plantas se mantuvieron durante 48 horas en cámaras de incubación. Se esperó ocho meses para la aparición de síntomas pero todos los resultados fueron negativos bajo las condiciones del experimento.

Para ulteriores investigaciones se recomienda inocular la bacteria clave en hojas debidamente marcadas de plantas adultas, en un área contaminada. De esta manera se tendrán las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad y así se podrá afirmar o negar si efectivamente la bacteria clave es la causante de la enfermedad.

I. INTRODUCCION

"Una civilización avanzada depende en gran medida de la capacidad humana para administrar el sistema ecológico del cual forma parte, de tal manera que una fracción pequeña del grupo pueda producir alimentación y energía suficientes para todos. Al facilitar este proceso, la agricultura sirve de base a tal civilización"(30).

Guatemala es un país agrícola. El cultivo del cardamomo (*Elettaria cardamomum*) es un cultivo que genera divisas al país además de ser fuente de trabajo para muchas personas.

La mancha foliar del cardamomo es una enfermedad que se le dio importancia en 1980 después de una helada en la zona norte cardamomera del país. Actualmente, la mayoría de plantaciones cardamomeras presentan este daño el cual se hace más severo en el período comprendido de noviembre a febrero. Esta enfermedad se presenta como una mancha amarilla de un milímetro de diámetro en su estado inicial. En estado avanzado es una mancha pardo claro con el centro oscuro y un halo clorótico que la rodea. El tejido en el área de la mancha se torna necrótico. No existe ningún patrón de distribución en la hoja. Generalmente las hojas inferiores son las más afectadas y los daños severos de la enfermedad afectan un 95% de las hojas de la planta.

Aunque no se ha cuantificado el daño económico, la mancha ya representa un problema debido a que los agricultores invierten dinero para combatirla. Además, su ataque puede llegar a cubrir casi totalmente a la hoja trayendo como consecuencia una disminución del proceso fotosintético. Esto lógicamente afecta a la planta y su producción. Se ha observado también manchas en el fruto que bajan la calidad del mismo. Cabe la posibilidad que sean causadas por el mismo agente que la mancha foliar.

Este trabajo se realizó con el fin de aislar el agente causante de la mancha foliar. En base a observaciones y experimentos preliminares se planteó la siguiente hipótesis: "El agente causante de la mancha foliar del

cardamomo es una bacteria". Para realizar la investigación se trabajó en el laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Se construyó un invernadero que se implementó con todo lo necesario. Se cultivaron plantas de cardamomo específicamente para la investigación. El método central del trabajo fueron los Postulados de Koch.

II. REVISION DE LITERATURA

A. Cultivo del cardamomo

El cardamomo (*Elettaria cardamomum* Maton) es una planta herbácea y perenne de la familia Zingiberaceae originaria de la India. Se utilizó por primera vez en el siglo VII como especie. Se dice que se importó de Europa en el año de 1244 d.C. Probablemente se introdujo a Centro América en el período colonial (31).

1. Características botánicas

a. Estructura

El cardamomo (*Elettaria cardamomum*) es una planta perenne, herbácea con un rizoma tuberoso horizontal. Este rizoma sostiene de 8 a 20 brotes erectos de 2.5 a 5.0 metros de alto. Estos están compuestos de hojas nacidas en forma de macollas. Las hojas son de dos láminas lanceoladas y terminadas en punta. De color verde oscuro y lisas en el haz, verde pálido en el envés. Miden 25 a 50 cm de largo y de 5 a 15 cm de ancho. El envés de la hoja puede ser liso o pubescente dependiendo de la variedad (2, 31).

La inflorescencia nace en la región radicular en la base de los brotes. Mide de 60 a 120 cm de largo. Son panículas erectas, alargadas y reclíndas o postradas. Posee brácteas medianamente largas de enrollamiento axilar, generalmente con dos o tres flores. Las flores son hermafroditas, zigomórficas, y miden aproximadamente 4 cm de largo y 1.7 cm de diámetro. Tienen 3 sépalos y 3 pétalos. Uno de éstos sobresale de los otros por ser más grande (labelo). El labelo está compuesto de tres estambres modificados, y es blanco con líneas púrpuras radiando del centro (2,31).

Hay dos estaminoídes rudimentarios separados y un estambre funcional el cual tiene un pequeño filamento amplio con una larga antera. El ovario inferior consta de tres carpelos unidos, con muchos óvulos en posición axilar, y un estilo con un pequeño estigma capitado. Posee cáliz doble, exterior cilíndrico, con dos lóbulos, cuatro divisiones externas y tres internas

donde se encuentran los óvulos. La bracteola es tubular como el cáliz. El tubo de la corola es aproximadamente del mismo largo que el del cáliz, con tres lóbulos angostos, frondosos y de color verde pálido (2,31).

El fruto es una cápsula indehisciente de 10 a 20 mm de largo y 5 a 10 mm de diámetro con 3 celdas y 3 valvas de color verde amarillento en su estado maduro. En cada celda se localizan de 5 a 7 semillas de 3 a 4 mm de largo cada una, de forma irregular, angulosas, duras, de color pardo y superficie áspera con una cubierta mucilaginosa. En cada cápsula hay de 15 a 20 semillas (2).

b. Polinización

Las flores son alógamas y los principales insectos polinizadores son las especies *Trigona sp.*, *Bombus sp.*, y *Apis mellifera* de las familias Apidae y Bombidae (18).

c. Sistemática

El cardamomo silvestre y cultivado pertenece a la especie *Elettaria cardamomum* Maton. Dos variedades botánicas han sido reconocidas en base al tamaño del fruto.

c.1. Variedad major Thwaites

Esta es una planta robusta de aproximadamente tres metros de altura, con pseudotallos rosados, hojas amplias y panículas erectas. El ovario y cáliz son subtomentosos. El fruto es alargado de 2.5 a 5.0 cm de largo, levemente arqueado, amarillo verdoso cuando está maduro y pardo oscuro cuando se seca. Este cardamomo es el silvestre de Sri Lanka, el cual es cultivado sólo ocasionalmente.

c.2. Variedad cardamomum (sinónimos de la Variedad minor)

Incluye la mayoría de razas cultivadas. Su altura puede variar desde 2.5 a 5.0 metros de altura. La panícula es larga con flores más numerosas que la variedad anterior. La panícula puede ser postrada, arqueada o erecta. El ovario y el cáliz son lisos. Los frutos son más pequeños que los de major Thwaites, con menos semillas, más pequeñas y más aromáticas. Los frutos se vuelven amarillos al secarse. Las razas más importantes dentro de esta variedad son las que se describen a continuación.

c.2.1. Cardamomo de Malabar

Raramente exceden los 2.7 metros de altura. Poseen ramas cortas. Las hojas miden de 30 a 45 cm de largo y son pubescentes en la superficie interior. Las panículas son de 60 a 90 cm de largo y postradas. Los frutos son pequeños, globosos, redondeados u ovoides y levemente encorvados.

c.2.2. Cardamomo de Mysoure

Puede llegar a medir hasta 5 metros de altura. Posee hojas gruesas y largas sin pubescencias en la superficie del envés. Las panículas son erectas o arqueadas y los frutos largos, fusiformes, triangulados y lisos (31).

2. Ecología del cultivo

La planta es propia de regiones húmedas, con alta precipitación pluvial bien distribuida durante todo el año. Su requerimiento está entre los 2000 y 3000 mm de lluvia anuales. Se desarrolla bien a una temperatura de 20 a 25°C. La planta se adapta mejor a las alturas comprendidas entre los 900 a 1300 metros sobre el nivel del mar. Requiere de un 70 a 80% de humedad relativa. Los suelos aconsejables para su cultivo son los de clase textural franco-arenosa con estructura estable y ricos en materia orgánica. El cardamomo requiere un buen drenaje (2,5).

3. Importancia económica

Guatemala es de los pocos países que tienen áreas con condiciones de clima y suelos adecuados para la producción de cardamomo. Lo que conjuntamente con las perspectivas favorables del mercado mundial de la especie, hacen aconsejable apoyarlo para que aumente su ritmo de crecimiento y así tener un buen ingreso de divisas para el país.

Una de las principales ventajas del cultivo lo constituye el hecho de requerir un uso intensivo de mano de obra. En las zonas adecuadas para el cultivo existe abundancia de mano de obra, lo que permite fomentarlo entre grandes y pequeños productores, ayudando así a la estabilización de la paz social del país (12).

B. Bacterias fitopatógenas

Las bacterias al infectar un huésped generalmente causan síntomas tales como pudriciones, manchas foliares, amarillamientos, tizones, enfermedades vasculares y agallas. Todas las bacterias fitopatógenas son saprófitas facultativas. Las enfermedades bacterianas ocurren principalmente en lugares que son húmedos y calientes. Pueden afectar casi cualquier tipo de planta y bajo condiciones propicias pueden llegar a ser muy destructivas (1,29).

1. Características

a. Morfología

Las bacterias fitopatógenas tienen forma de bastón, con la excepción del género *Streptomyces* que son filamentosas. Las bacterias en forma de bacilo son más o menos pequeñas y cilíndricas, cuyo tamaño oscila de 0.6 a 3.5 μm de largo y de 0.5 a 1.0 μm de diámetro. La mayoría tienen flagelos en forma de hilos que son considerablemente más largos que la célula. Tienen paredes celulares fuertes y rígidas, las cuales están cubiertas por una cápsula de material gomoso que puede ser gruesa o delgada. La cápsula parece estar asociada en algunos casos con la patogenicidad de la bacteria. La pared celular permite el paso de nutrientes hacia el interior de la célula y el paso al exterior de materiales de deshecho, enzimas digestivas y otros productos que debe eliminar la bacteria (1,29).

El material encerrado por la pared celular es el protoplasma, el que consiste de la membrana citoplásmica que determina el grado de permeabilidad selectiva de las sustancias que pasan dentro y fuera de la célula. El protoplasma contiene miles de ribosomas, membranas y uno o más cromosomas (1,29).

Las bacterias son muy difíciles de observar en el microscopio compuesto. Cuando se cultiva una bacteria en un medio nutritivo, su progenie produce una masa visible llamada colonia. Estas colonias de las diferentes especies pueden presentar variaciones de forma, tamaño, color, tipo de orilla, elevación, etc., las que pueden medir desde una fracción de milímetro hasta varios centímetros de diámetro. Pueden ser circulares, ovaladas o irregulares. Sus orillas pueden ser onduladas, angulares, lisas, etc. La elevación puede ser plana, cóncava, elevada, etc., y su coloración puede va-

riar entre los tonos de blanco, gris, amarillo, rojo u otro color. Algunas producen pigmentos difusos en el agar (1,7).

b. Reproducción

Las bacterias fitopatógenas en forma de bacilo se reproducen por fisión a gran rapidez. Bajo condiciones favorables las bacterias se pueden dividir cada 20 minutos. De esta manera, una bacteria puede producir un millón de bacterias en 10 horas. La reproducción de éstas se ve limitada por la disminución de alimento, acumulación de desechos metabólicos y otros factores. A pesar de esto las bacterias sí alcanzan números enormes en corto tiempo y causan cambios químicos en su medio. Estos cambios causados por las grandes poblaciones de bacteria son los que hacen de tanta importancia el estudio de las enfermedades bacterianas (1,16).

c. Ecología y diseminación

Algunas bacterias pueden formar endosporas muy resistentes. Estas se producen de la cápsula que envuelve a la bacteria. Las endosporas son capaces de resistir prolongados períodos de sequía o exposiciones a altas temperaturas. Casi todas las bacterias fitopatógenas se desarrollan principalmente en la planta huésped como parásitos pero también parte de su ciclo en el suelo como saprófitos. Existe mucha diferencia en el grado de desarrollo en cada ambiente entre especies. Pueden también sobrevivir en o sobre semillas de plantas o insectos. La diseminación de las bacterias de una planta a otra o a otras partes de la misma planta se lleva a cabo principalmente por la acción de vehículos como el agua, viento, roce de material vegetativo enfermo con sano, animales y el hombre. Aún las bacterias que tienen flagelos se pueden mover muy poco por sí solas (1,16).

d. Clasificación e identificación

Según Agrios (1), la clasificación más reciente es en la que se incluyen las bacterias dentro del Reino Prokariota que incluye organismos celulares que no muestran una clara diferenciación entre el núcleo y el citoplasma. Este reino incluye las bacterias y algas verde-azules. Las bacterias fitopatógenas se clasifican dentro de la Clase I (Bacterias) de la División II (bacterias indiferentes a la luz). La Clase Bacteria se subdivide en 16 partes, 3 de las cuales corresponden a las bacterias fitopatógenas.

El número total de especies fitopatógenas aún no se establece entre los expertos.

La Parte I incluye bacilos gram negativo y cocos aeróbicos. Dentro de este grupo se encuentran dos familias.

d.1. Familia Pseudomonadaceae que está integrada por bacterias heterotróficas que atacan azúcares oxidándolas o fermentándolas. A esta familia pertenecen los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (29).

Las bacterias que pertenecen al género *Pseudomonas* son bastones rectos o curvados. Miden de 0.5 a 1.0 μm por 1.5 a 4.0 μm . Se mueven gracias a uno o muchos flagelos polares. Muchas especies habitan el suelo y el agua dulce o salada. Muchas bacterias patógenas atacan plantas, sin embargo pocas afectan al hombre o a los animales. En las plantas causan manchas foliares, marchitamiento, rayas foliares y enfermedades similares. Pueden producir pigmentos verdes o morados (1,24,29).

El género *Xanthomonas* está integrado por bastones rectos que miden de 0.4 a 1.0 μm por 1.2 a 3.0 μm . Posee un flagelo polar que les permite moverse. Sus colonias en medios nutritivos son generalmente de color amarillo. La mayoría crecen lentamente. Todas las especies de este género son fitopatógenas y se encuentran viviendo únicamente en asociación con plantas o material de plantas. Generalmente causan necrosis en las plantas (1, 24,29).

d.2. Familia Rhizobiaceae que incluye a los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*. Son bacterias heterotróficas que generalmente tienen de 1 a 6 flagelos.

Las bacterias del género *Rhizobium* son capaces de fijar el nitrógeno libre cuando viven en simbiosis con las plantas. El género *Agrobacterium* está formado por bacterias en forma de bastones de 0.8 por 1.5 a 3.0 μm . Son móviles debido a la presencia de 1 a 4 flagelos. Cuando se cultivan en medios que contienen carbohidratos, producen abundante secreción viscosa de polisacáridos. Las colonias que forman no tienen pigmento y usualmente son lisas. En forma libre viven en la rizosfera o en el suelo. Pueden parasitar también el tallo (1,24,29).

La parte II está formada por bacterias gram negativo que sean anaeróbicas facultativas. Únicamente la integra una familia.

d.3. Familia Enterobacteriaceae que son fermentadoras activas. Estas bacterias no tienen movilización. El género *Erwinia* es el único de la familia. Son bastones rectos de 0.5 a 1.0 μm por 1.0 a 3.0 μm . Todas las especies del género son fitopatógenas. Causan necrosis seca, agallas, marchitamientos y pudriciones blandas (1,24,29).

La Parte III incluye Actinomicetos y los organismos relacionados a éstos. Esta parte está integrada por dos familias.

d.4. Familia formada por las bacterias con corineforma. Dentro de esta familia se encuentra el género *Corynebacterium*. Los miembros de este género son gram positivo. Tienen forma de bastón que puede ser recto o levemente curvados de 0.5 a 0.9 μm por 1.5 a 4.0 μm . Generalmente no tienen movilidad, pero algunas especies se mueven por uno o dos flagelos polares. Pueden ser tanto aeróbicos como anaeróbicos (1,29).

d.5. Familia Streptomycetaceae a la que pertenece el género *Streptomyces*. Las bacterias de este género son gram positivo. Todas las especies viven en el suelo. Producen conidios en hifas aéreas y su micelio rudimentario es muy ramificado (1,29).

C. Manchas foliares

Una planta está enferma cuando una o más de sus funciones metabólicas son alteradas debido a un patógeno o a ciertas condiciones ambientales. Algunas veces la reacción de la planta es de naturaleza química e invisible, otras veces puede que la reacción se extienda y se den cambios histológicos que se manifiesten macroscópicamente los cuales constituyen los síntomas de la enfermedad. En el caso que la infección permanezca latente o sea sin la aparición de síntomas, puede que éstos aparezcan cuando las condiciones ambientales le sean propicias o la planta haya alcanzado determinada etapa de madurez.

Las células y tejidos de plantas enfermas son debilitados o destruidos por el agente biótico o abiótico causante de la enfermedad. Así se ve mer-

mado o eliminado el funcionamiento normal de las células y tejidos. El tipo de célula y tejido que se infecta determina la función fisiológica que se verá afectada. En el caso de una infección en el follaje como son los tizones, mosaicos y manchas foliares, se interviene la fotosíntesis (1).

Un tipo de síntoma es la muerte de células o necrosis. Cuando la necrosis está restringida a un área se dice que es una necrosis localizada. La necrosis localizada o mancha, es uno de los síntomas más comunes en enfermedades bacterianas. Las bacterias invaden y se multiplican en las cavidades subestomatales, y en espacios intercelulares y causan áreas necróticas localizadas. Estas manchas afectan a las células parenquimatosas. Pueden aparecer en hojas, tallos, frutos y brotes tiernos. Muchas veces su inicio se observa como pequeñas áreas acuosas. Con el tiempo las células mueren dando como resultado una mancha parda o negra, generalmente circular y en algunos casos con un halo amarillo alrededor (1,16,29).

En climas húmedos el tejido infectado muchas veces produce masas de bacterias que se esparcen a tejido sano donde inician una nueva infección. La mayoría de manchas bacterianas son causadas por bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. Muchas veces los tizones son la expresión final de ataques severos de manchas. En dichos casos, las manchas pueden ser tan numerosas que destruyan la mayoría de la superficie de las hojas y la planta aparece atizonada (1).

Las manchas localizadas en las hojas pueden ser también síntomas característicos de virus. Los hongos pueden producir síntomas similares, desde manchas pequeñas necróticas hasta áreas grandes necróticas ovaladas (29).

1. Manchas foliares del cardamomo

a. Causadas por bacterias

a.1. Daño foliar por una posible bacteriosis

Se presenta como una necrosis en los tejidos de las hojas, la cual algunas veces se desarrolla partiendo de la vena central hacia las orillas de la hoja. La mancha da un color pardo en el tejido enfermo con apariencia acuosa. Aparece con mayor frecuencia durante el invierno. Se recomienda graduar la sombra y limpiar constantemente (11).

a.2. Tizón bacteriano o Chenthal

Esta enfermedad fue reportada en la India. Es causada por *Corynebacterium sp.* Su control se realiza con penicilina el cual resulta satisfactorio (9,10).

b. Causadas por hongos

b.1. Daño foliar por una posible *Cercospora*

Esta enfermedad afecta el sistema foliar y los frutos. En las hojas el daño se manifiesta por una mancha de color pardo claro con un halo gris en el centro de la mancha. En el fruto, las manchas son similares con la consiguiente reducción en su calidad. En la India se reportó una mancha foliar causada por *Cercospora zingiberi*. Su daño prevalece durante todo el año, aunque se hace más severo después de las lluvias. Luttmann (17), afirma que el daño en Guatemala se debe a *Cercospora sp.*, la cual se propaga por esporas que aparecen sobre el haz de las hojas (11,17,21).

Esta mancha se inicia por puntos de color rojizo que van aumentando de tamaño con el tiempo hasta que finalizan siendo manchas de forma circular, color pardo en el centro y amarillo en la orilla. Estas crecen hasta invadir completamente la hoja (17).

Para su control se recomienda buena ventilación y una sombra uniforme, bien regulada desde la plantación en el campo definitivo. Si la plantación ya está bien formada, se debe sembrar arbustos de rápido desarrollo para que aporten una sombra adecuada (11,17). Algunos autores (11,14), recomiendan un control químico con cobre. Otros (17), sin embargo consideran esto problemático en sus bases técnicas y económicas debido al follaje de las plantas de cardamomo.

En una investigación hecha en la India acerca de la susceptibilidad varietal a *Cercospora zingiberi*, resultaron más resistentes las plantas de inflorescencia erecta que postrada (21).

b.2. Mancha de la hoja en almácigo

Es una enfermedad del almácigo aunque algunas veces se ha visto en el campo. Está causada por el hongo *Phyllostica elettariae*. Los

síntomas se presentan como manchas circulares pardas con un punto gris en el centro. Con el tiempo, la hoja se torna amarilla y se seca. Las hojas más jóvenes son más susceptibles que las hojas inferiores. Las plantas mayores son más resistentes. La variedad Malabar es muy susceptible (15, 19,22).

b.3. Mancha foliar causada por *Sphaceloma cardamomi*

Esta es una mancha que se reportó en la India. Prevalece durante todo el año aunque su daño es más severo después del período de lluvias (21).

b.4. Herrumbre del cardamomo

Causada por *Phakopsora elettariae*. Es una enfermedad que fue reportada en la India (20).

b.5. Mancha foliar causada por *Phaeotrichoconis crotalariae*

El agente causante de la enfermedad es un hongo que ataca tanto las hojas viejas como las jóvenes. Su daño se presenta como áreas irregulares con apariencia de papel blanquecino con un margen pardo. Bajo condiciones de humedad, las áreas necróticas se agrandan y se unen. En condiciones secas, la parte central de la lesión se seca y luego se quiebra (6,26).

En los Cuadros 1 y 2 se resumen las enfermedades más comunes del cardamomo en Guatemala.

D. Diagnósis

Los dos aspectos visibles en los que se basa la diagnóstico en las enfermedades de plantas son síntomas y signos. Los síntomas son expresiones o respuestas de la planta a un ataque. Signos, son la presencia del patógeno o sus partes (29).

La diagnóstico de manchas y tizones bacterianos se hace en base a la morfología de los síntomas, la ausencia de otros patógenos y la presencia de un gran número de bacterias en el área afectada. Si la lesión no presenta signos de hongo, conviene siempre inducir la esporulación. Esto se hace

Cuadro 1. Enfermedades más comunes del cardamomo en Guatemala según DIGESA

Procedencia	Patógeno
Finca El Zapote, Escuintla	<i>Colletotrichum</i> , <i>Cercospora</i>
Caserío Pasac, Aldea Xejuyup, Nahualá, Sololá	Bacterias
Finca Sacoyou, Cobán, Alta Verapaz	Bacterias
Panzós, Alta Verapaz	Bacterias
Costa Sur, productora de cardamomo	Virus del mosaico
Finca San Isidro, Cobán, Alta Verapaz	Virus del mosaico
Plantaciones de cardamomo del departamento de Alta Verapaz en forma generalizada	<i>Cercospora</i>

Fuente: Laboratorio de Parasitología, Departamento de Sanidad Vegetal, DIGESA, Ministerio de Agricultura, 1980.

Cuadro 2. Enfermedades más comunes del cardamomo en Guatemala según el Instituto Técnico de Capacitación y Productividad

Nombre común	Incitante	Síntomas	Organo afectado	Localización
Tizón foliar	Bacteria?	Manchado y necrosis de hojas y cápsulas	Hojas, tallos y cápsulas	Lugares fríos y húmedos
Marasmius	Marasmius?	Parte envainadora	Base del tallo	Costa del Pacífico
Pudrición	<i>Pythium sp.</i>	Pudrición de raíces y rizomas	Raíces	General
Mosaico	Virus	Mosaico típico	Hojas y tallos	Costa del Pacífico

Fuente: GUATEMALA. Instituto Técnico de Capacitación y Productividad. Manual del cultivo del cardamomo. Guatemala, 1981. 29 p.

incubando hojas en cámaras de humedad. La forma más adecuada en probar que una bacteria es el patógeno, consiste en el aislamiento de la bacteria en un cultivo puro, para inocularla en plantas sanas en donde teóricamente se producirán los síntomas de la enfermedad. Una prueba que no debe omitirse al aislar una bacteria desconocida es la prueba de gram (1,27,28).

1. Aislamiento

a. Medios de cultivo

Las bacterias fitopatógenas se pueden dividir en dos grandes grupos. Un grupo lo integran aquellas que pueden ser fácilmente aisladas de las lesiones de las plantas y que crecen en medios bacteriológicos estándar. Estas tienen requerimientos de nutrientes específicos que no pueden manufacturar de las sustancias presentes en el medio. Se les llama "fastidiosas" (24,28).

Los miembros del primer grupo se pueden diferenciar relativamente fácil en base a las características de las colonias en ciertos agares y algunas pruebas claves como la prueba de gram. Los miembros del segundo grupo son relativamente nuevas para los fitopatólogos y se tratan de identificar en base a su crecimiento en medios complejos, presencia o ausencia de pared celular, prueba de gram y anaerobiosis obligada (28).

Cuando el posible causante de una enfermedad es una bacteria, es aconsejable aislarla en medios con peptonas, extracto de carne, o levadura, lo cual permite el crecimiento de una diversidad de bacterias y otros organismos. El extracto de carne contiene las sustancias solubles en agua de tejido animal. Estas incluyen carbohidratos, compuestos nitrogenados orgánicos, vitaminas hidrosolubles y sales. Las peptonas son la fuente principal de nitrógeno orgánico, pueden contener también algunas vitaminas y algunos carbohidratos dependiendo del tipo de material proteínico digerido. Son también fuente que da acceso fácil al carbono. El extracto de levadura es muy rico en vitaminas del complejo B. También posee nitrógeno orgánico y compuestos orgánicos (7,24,27,28).

La temperatura, ambiente gaseoso y pH son factores físicos que también deben tomarse en consideración al establecer condiciones óptimas para el cultivo de la mayoría de especies bacterianas (24).

b. Cultivos

Las muestras de plantas enfermas a utilizar deben estar en buenas condiciones y presentar tantos estados de evolución de la enfermedad como sea posible. Se deben mantener protegidas del calor y de la pérdida de agua (27).

Hay varias técnicas para aislar los agentes causantes de una enfermedad. Dentro de éstas están el raspado de la lesión, colocación del tejido en el medio nutritivo y maceramiento del tejido infectado. Luego de hacer el cultivo, se pueden observar las colonias de bacterias y procederse al aislamiento para obtener cultivos puros (1,24,28).

2. Inoculación

En el laboratorio hay diferentes maneras de preparar el inóculo. Un método muy utilizado es incubar las bacterias de cultivos puros en soluciones nutritivas. Otro método es preparar el inóculo directamente del tejido lesionado. Este método se utiliza cuando los cultivos en medios nutritivos pierden su virulencia. Es importante mencionar que la concentración de inóculo puede afectar la severidad de la enfermedad aún bajo condiciones ambientales favorables (8,25,28).

La inoculación consiste en la introducción de inóculo en la planta. En la naturaleza, la penetración de las bacterias en las plantas es por aberturas naturales o heridas. En el laboratorio se imitan estas maneras con diferentes técnicas. Se pueden utilizar alfileres o instrumentos punzantes para hacer orificios en la planta, sumergir fruta caliente en suspensiones frías de inóculo de manera que haya infiltración al fruto del agua que transporta a las bacterias, asperjar a presión, frotar con abrasivos e inyectar (1,3,4,8,23,25).

3. Incubación

El período de incubación puede depender de la combinación patógeno-hospedero, estado de desarrollo del hospedero, temperatura, humedad y estado de patogenicidad del patógeno. En el laboratorio las cámaras de incubación favorecen la incubación del patógeno inoculado en las plantas (4,8, 23).

Los síntomas pueden aparecer en un rango amplio de tiempo, rápidamente después de 2 a 4 días o hasta 2 a 3 años después de la inoculación. Generalmente los síntomas aparecen de unos días a unas semanas después de la inoculación (1).

III. MATERIALES Y METODO

A. Localización del área experimental

Se trabajó con plantas provenientes del almácigo en la Finca Acacias, situada en el Municipio de Nueva Concepción, departamento de Escuintla, Guatemala. Este municipio se encuentra a una altura de 60 a 70 metros sobre el nivel del mar y su temperatura promedio anual es de 28 °C. El estudio se desarrolló en el laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala donde se construyó un invernadero.

B. Materiales empleados

Las muestras de hojas infectadas eran proporcionadas por el extensionista de la zona norte y sur cardamomera del país. Se cortaban hojas enfermas en el campo y rápidamente se introducían a bolsas plásticas. Estas muestras se traían el mismo día al laboratorio donde se guardaban a una temperatura de 4 °C.

Se observaron varias muestras bajo el estereoscopio y se hicieron raspados de la lesión para observar al microscopio. En la Figura 1 se puede observar un esquema general del método inicial, el cual se describirá a continuación. Para inducir esporulación se hicieron dos tipos de cámaras de humedad. En la primera, dos cortes de cada uno de los tres estados de la mancha (joven, adulto y viejo) se colocaron en seis cajas petri con una servilleta mojada. Se taparon las cajas y se colocaron dos a una temperatura ambiente, dos a 26 °C y dos a 28 °C, donde se dejaron por dos semanas. En el segundo tipo, de cada uno de los tres estados se colocaron dos cortes en tres tapaderas de cajas petri que fueron colocadas en una caja plástica de 40 cm por 30 cm y 20 cm de alto previamente forrada en su fondo por servilletas empapadas de agua. La caja plástica se dejó cerrada por dos semanas en una incubadora a 26 °C.

Se hicieron medios de cultivo tanto para el aislamiento de bacterias como de hongos. Entre los medios de cultivo que se utilizaron para el aislamiento de bacterias se tienen los siguientes:

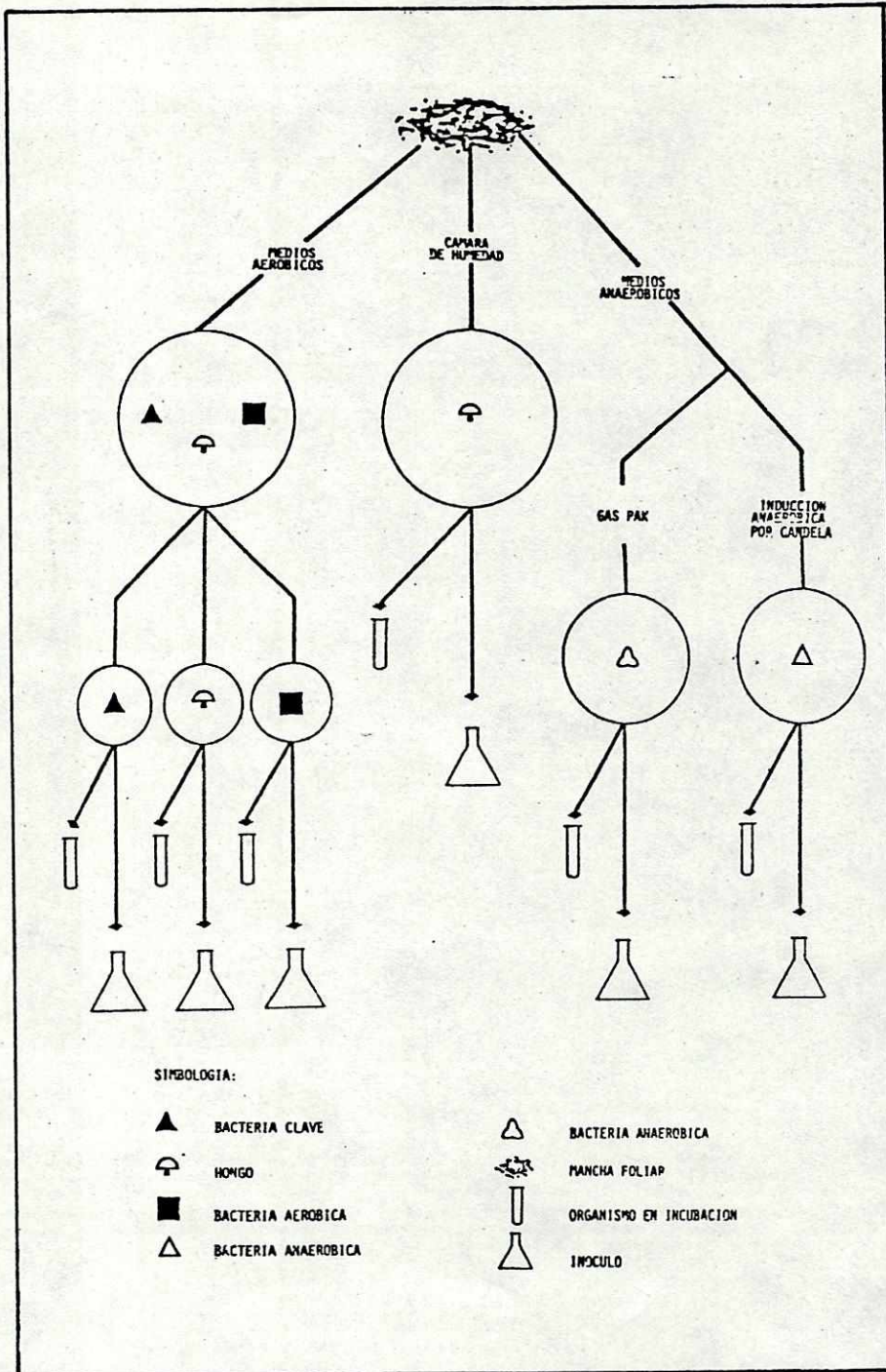


Figura 1. Esquema general para el aislamiento del organismo causante de la mancha foliar

1. Agar nutritivo glucosa (NGA)	g/l
Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Glucosa	2.5
Agar	15.0
2. Agar dextrosa-extracto de levadura-CaCO ₂ (YDC)	
Extracto de levadura	10.0
Dextrosa	20.0
CaCO ₂	20.0
Agar	15.0
3. Agar de caldo nutritivo-extracto de levadura (NBY)	
Caldo nutritivo	8.0
Extracto de levadura	2.0
K ₂ HPO ₄	2.0
KH ₂ PO ₄	0.5
Agar	15.0
50 ml de glucosa al 10%	
1.0 ml MgSO ₄ • 7H ₂ O 1M	
4. King's Medium B Agar (KB)	
Peptona proteosa	20.0
K ₂ HPO ₄ • 3H ₂ O	1.5
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1.5
Agar	15.0
15 ml glicerol	

Para el aislamiento de hongos se prepararon los siguientes medios de cultivo:

1. Papa-dextrosa-agar	g/l
Papa	200.0
Dextrosa	20.0
Agar	17.0

2. Agar de comida de conejo	g/l
Comida de conejo	25.0
Agar	15.0
3. Agar V-8	
CaCO ₂	3.0
Agar	20.0
200 ml jugo V-8	

Se preparó un agar especial de hoja de cardamomo. Se hizo con el extracto obtenido de la maceración de 50 g de tejido joven de hojas de cardamomo con agua. A este extracto se le agregó 4 g de agar derretido en 1/4 de litro de agua.

Todos los medios se autoclavearon por 15 minutos a una presión de 15 libras/ pulgada cuadrada y se virtieron tanto en cajas petri como en tubos de ensayo, observe las Figuras 2 y 3. Se mantuvieron a 4 °C agrupados en bolsas plásticas debidamente identificados.

Para hacer los cultivos se trabajó en la cámara ascéptica. Esta se limpió continuamente con alcohol y se le dejó prendida la luz ultravioleta cuando no se trabajó para mantenerla libre de contaminantes. El asa se sterilizó con etanol al 95% y con llama hasta el rojo vivo. Los rayados se hicieron de la forma convencional, a cuatro ángulos rectos. Se evaluaron tres distintas pruebas para determinar qué método era el más adecuado para hacer cultivos, ver Figura 4. Para los tres casos, se tomó muestras de hojas infectadas. Se cortaron cuadros pequeños (0.5 por 0.5 cm) de manchas, los cuales se dejaron por tres minutos en clorox al 10%. Luego se lavaron con agua destilada. La primera prueba consistió en el raspado de la lesión con el asa esterilizada para luego hacer el rayado en el medio de cultivo. Para la segunda prueba se tomó el tejido con el asa esterilizada y se rayó el medio nutritivo con él, el cual se dejó dentro de la caja petri. Este fue el método utilizado posteriormente. En la tercera prueba se pesaron 10 gramos de tejido que se maceraron. Con este macerado se hicieron tres diluciones en agua destilada en proporciones: 1:10, 1:100 y 1:1000. Con el asa esterilizada se hizo el rayado utilizando cada dilución en los diferentes medios nutritivos.

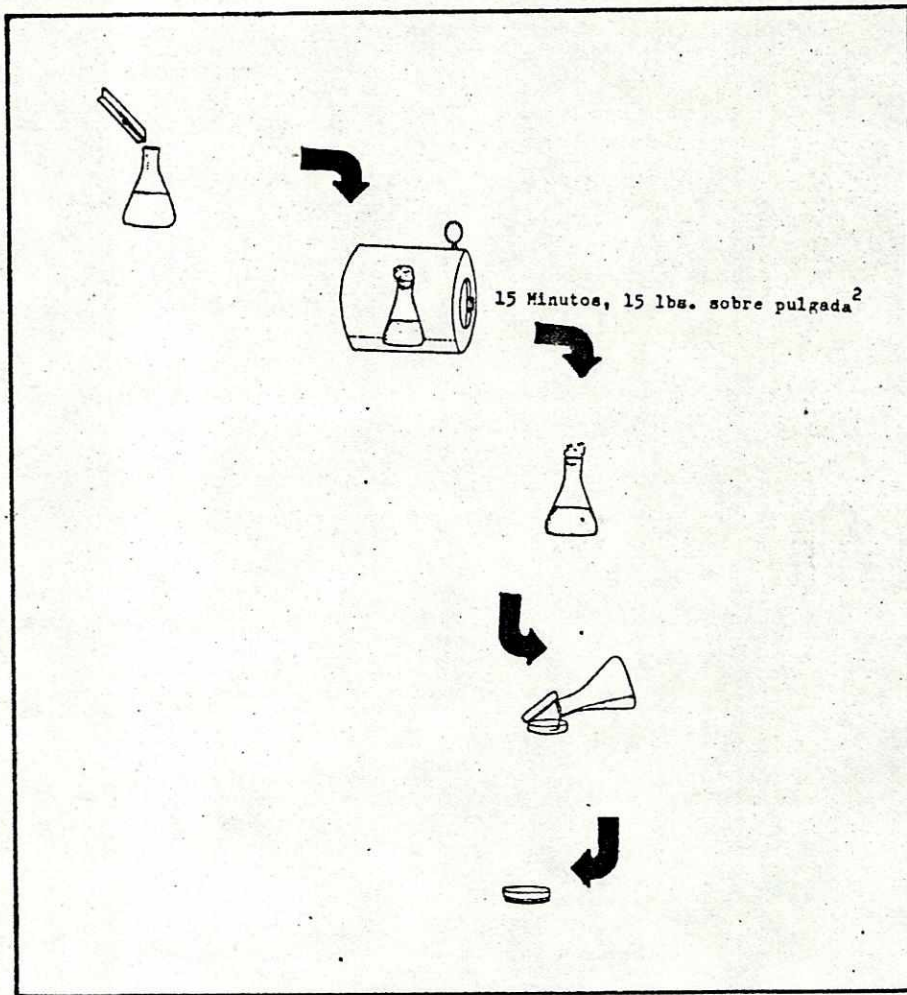


Figura 2. Preparación de medios nutritivos para cajas petri

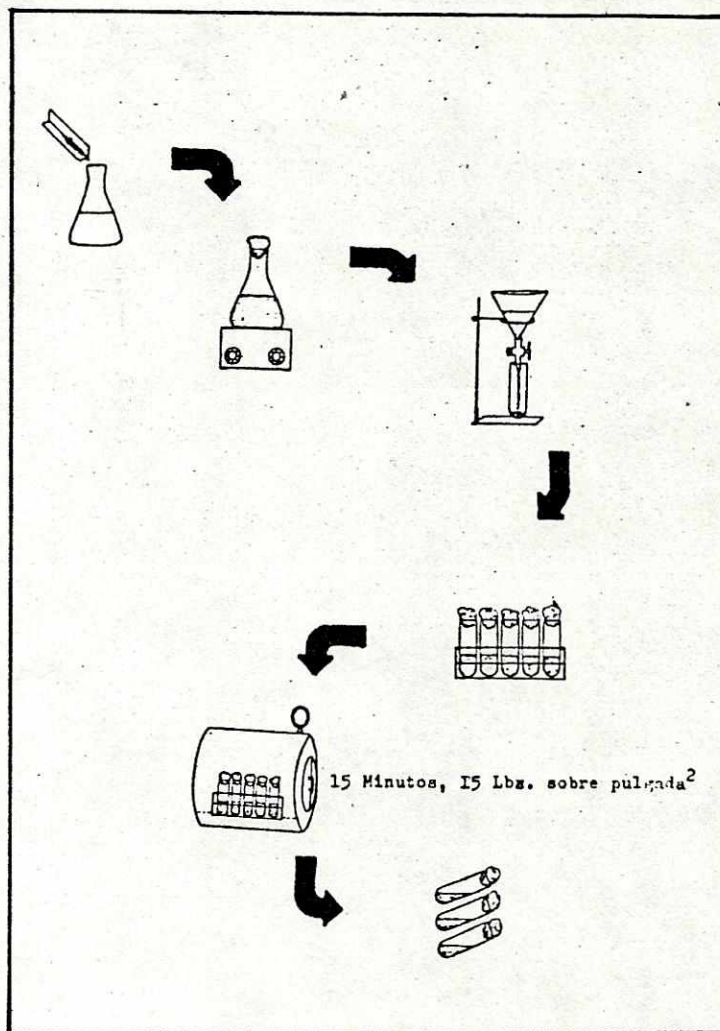


Figura 3. Preparación de medios nutritivos para tubos

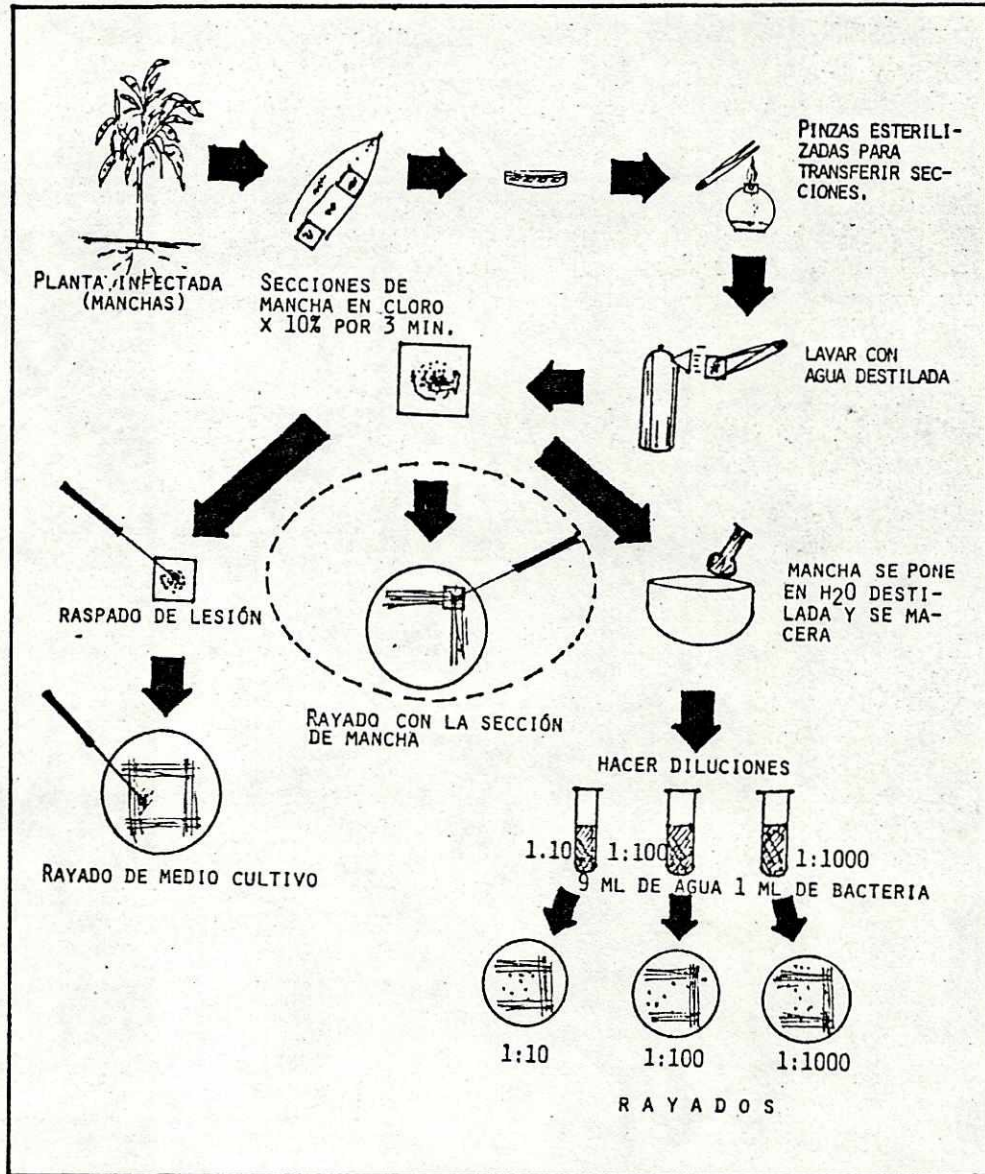


Figura 4. Métodos para hacer cultivos

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

De cada medio nutritivo para el aislamiento de bacterias (nutritivo-glucosa, dextrosa-extracto de levadura-CaCO₂, caldo nutritivo-extracto de levadura y King's Medium B) se hicieron cuatro repeticiones de cultivo utilizando el método de rayado con el tejido. Las colonias se aislaron a cultivos puros en dos tubos de ensayo y una caja petri del mismo medio nutritivo manteniéndose en la incubadora a 26 °C como puede observarse en la Figura 5.

Se hizo también cultivos anaeróbicos en "Gas Packs" donde se colocaron dos repeticiones de cada uno de los medios mencionados en el párrafo anterior además del agar de cardamomo. Se trató de crear un ambiente anaeróbico también colocando una candela encendida dentro de un bote con los cultivos que posteriormente se cerraba. Dentro de las pruebas de identificación, se hizo la prueba de gram.

Se preparó inóculo de bacterias a partir de cultivos puros y directamente de las lesiones. Como se observa en la Figura 6, cuando los cultivos puros tenían cinco días se procedía a preparar el inóculo. Se tomó con el asa esterilizada una masa de células de una colonia de bacterias. Esta se colocó en un erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de NBY líquido (sin agar) y se dejó durante 15 horas en un rotador dentro de la incubadora a 26 °C. Luego se tomó 1 ml de la suspensión y se le agregó a 50 ml de NBY líquido. Nuevamente se le dejó incubando en el rotador dentro de la incubadora por un tiempo de 4 a 6 horas, hasta alcanzar turbidez en la suspensión. Se leyó en el espectrofotómetro la absorvancia de cada suspensión de inóculo. Este tipo de inóculo se aplicó en las plantas de cinco distintas maneras que son frotado, cortado, inyectado, agujereado y asperjado. El método de frotado consistió en la aplicación de carborundum en el haz y envés de tres hojas de cada planta donde se frotó el inóculo con un mortero. En el segundo método, se hicieron cortes con una hoja de afeitar nueva a lo largo de la nervadura central de tres hojas a una distancia de 0.5 cm. Estos cortes se hicieron también en la parte superior del tallo a lo largo de 8 cm. Posteriormente el inóculo se aplicó con un mortero. Para el método de inyectado se utilizó una inyección de aguja sumamente delgada con la que se inyectó el inóculo en el tallo y la nervadura central de dos hojas. En el método de agujereado se utilizó una esponja redonda de 2.5 cm de diámetro a la que se le introdujo diez alfileres. Se sumergió la esponja en el inóculo y se hizo los agujeros en toda la superficie de la hoja principalmente en la nervadura central. Simultáneamente se exprimió el inóculo de

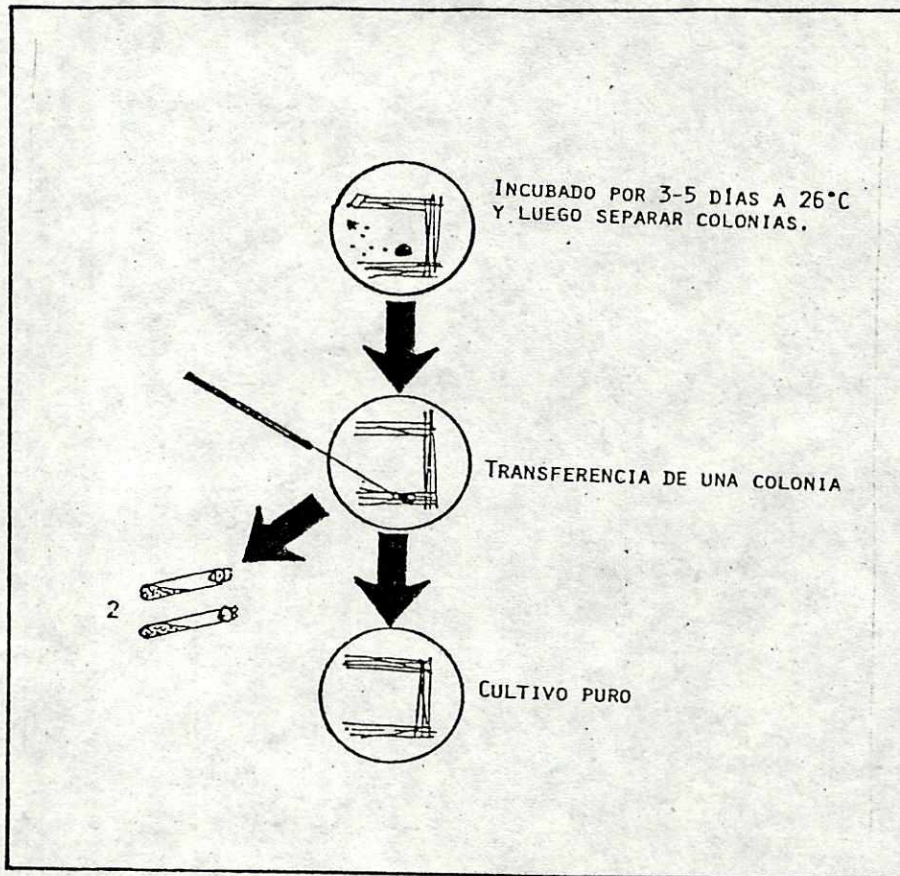


Figura 5. Aislamiento de colonias a cultivos puros

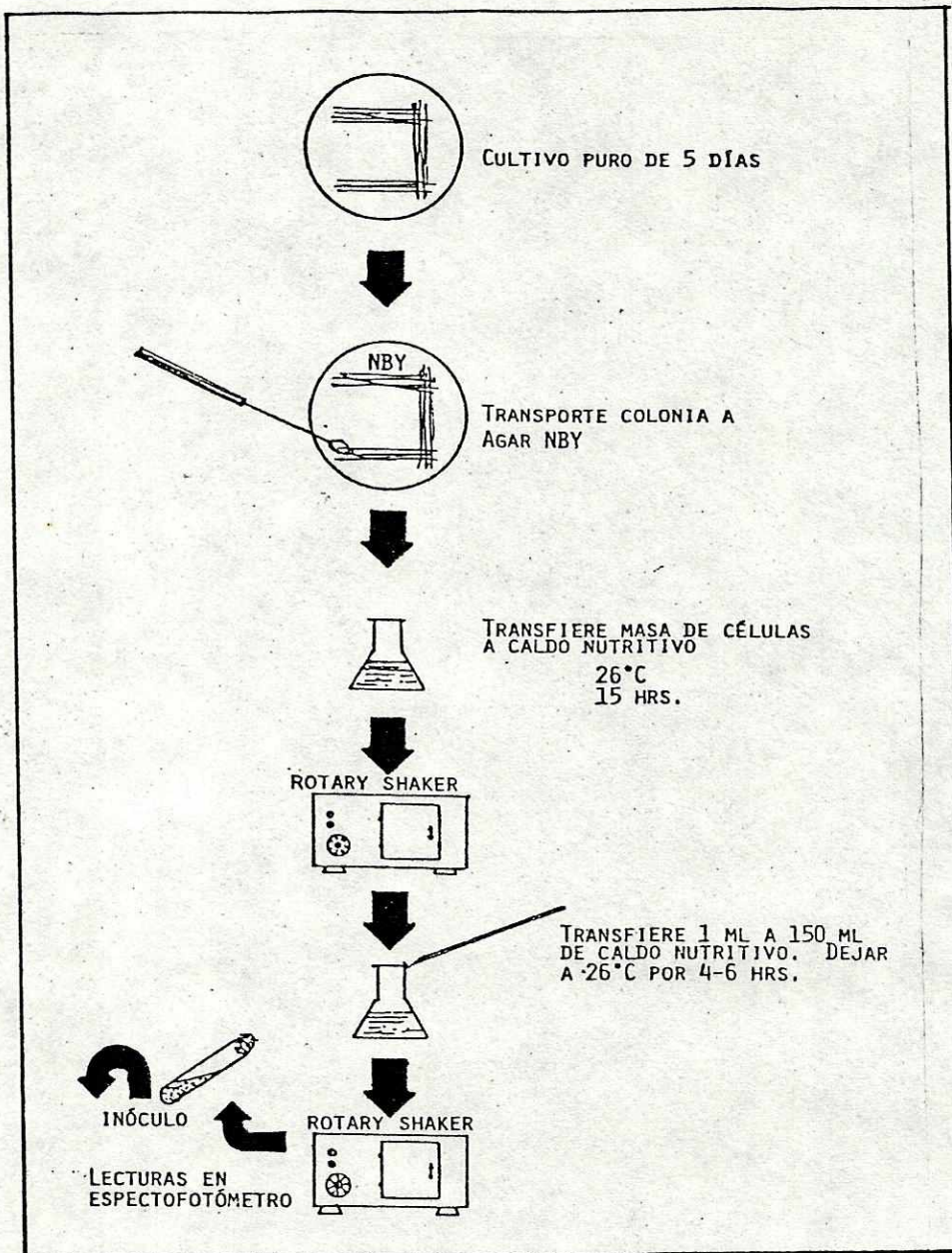


Figura 6. Preparación de inóculo a partir de cultivos de bacterias

la esponja, inoculándose así tres hojas por planta. Para el quinto método, el de aspersión, se vertió el inóculo con carborundum dentro de un soplete y se roció toda la planta a una presión de 30 a 40 libras/pulgada cuadrada.

El inóculo preparado a partir de manchas foliares, se hizo pesando un gramo de los tres distintos estados de la mancha: joven, adulto y viejo. Se maceraron las manchas de cada grupo separadamente y con agua destilada se hicieron diluciones 1:10. Esta clase de inóculo se aplicó únicamente con el método de agujereado descrito anteriormente, ver Figura 7.

La preparación de inóculo de hongos se hizo a partir de cultivos puros. En un caso, se procedió a lavar con agua destilada el cultivo esporulando y se recolectó el agua del lavado que contenía el hongo en suspensión. Esta suspensión se inoculó por los métodos de asperjado y agujereado. El otro método investigado fue el de cortar trozos de 1 por 1 cm de cultivo puro del hongo (con el medio nutritivo) los cuales se colocaron en las hojas sujetados por un alfiler. Se colocaron cinco trozos en cada una de las dos hojas inoculadas por planta.

Con el objeto de ver si la enfermedad se debía a la interacción de dos organismos, a un grupo de plantas se le asperjó hongo y se dejó en incubación para luego asperjarle inóculo de bacterias.

Para la incubación de bacterias y manchas, se construyeron ocho cámaras de humedad de marco de madera de 1.8 por 1.0 m que se cubrieron completamente con plástico transparente. En cada una se colocaron las ocho plantas inoculadas con el mismo organismo durante 48 horas. Después de las primeras 24 horas, se rociaron con agua dos veces. Luego de concluidas las 48 horas, se trasladaron al invernadero para esperar la aparición de síntomas.

Para la incubación de hongos se construyeron cajas de marco de madera de 1.0 por 0.45 m que se cubrieron con plástico negro. En éstas se colocaron las plantas inoculadas durante 48 horas. Se rociaron de la misma manera que para el caso de las bacterias. Luego de transcurridas las 48 horas, se dejaron en una sombra alejadas del invernadero.

En la Figura 8 se puede observar un esquema de los distintos métodos de inoculación usados y su incubación.

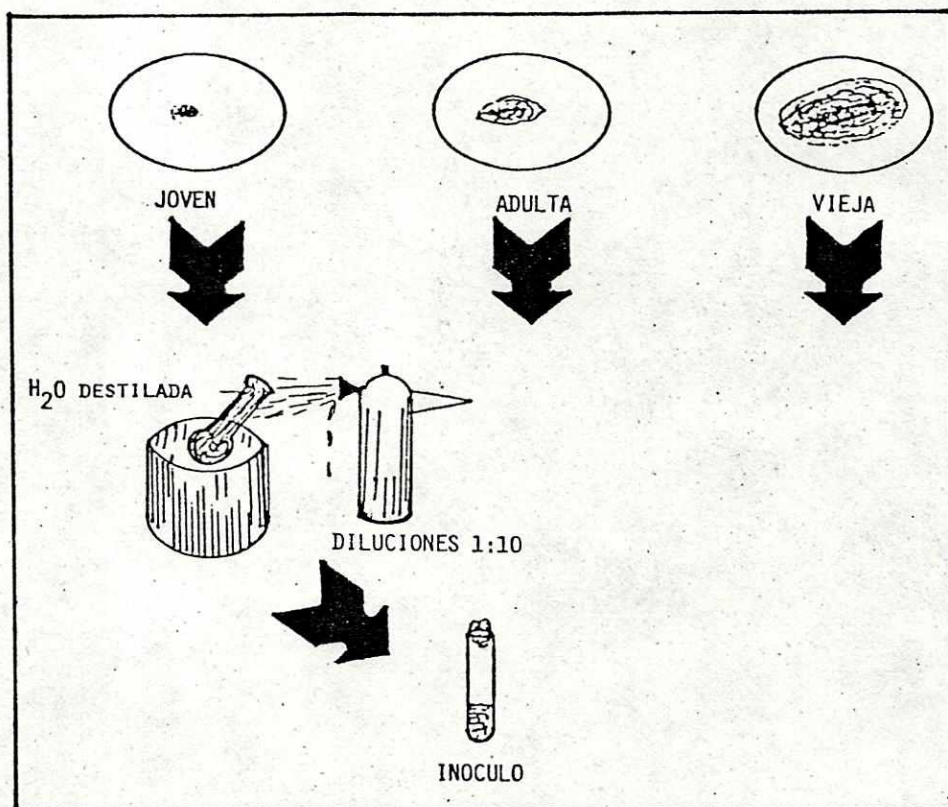


Figura 7. Preparación de inóculo a partir de mancha foliar

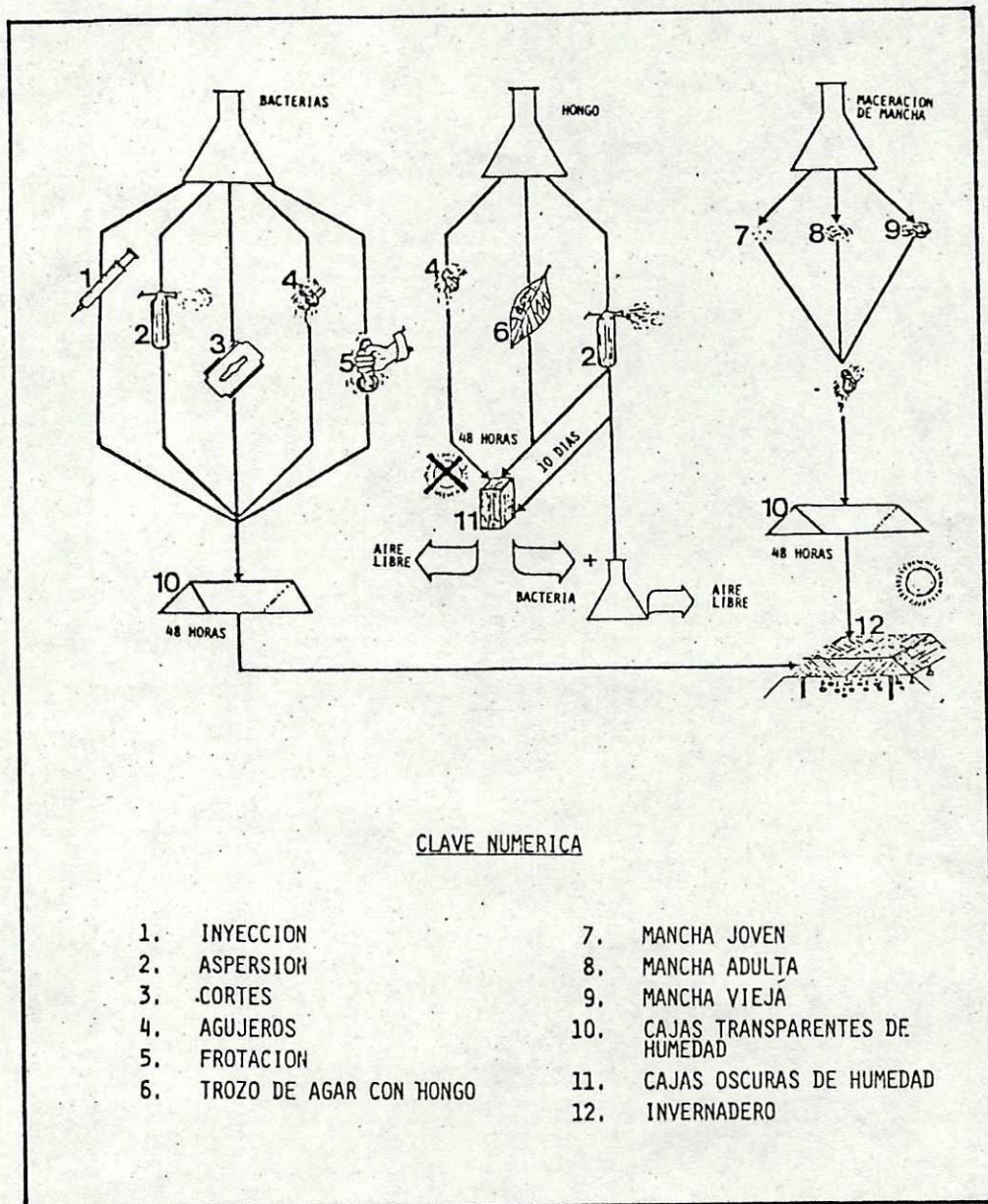


Figura 8. Esquema general de métodos de inoculación e incubación.

Como pruebas fuera del laboratorio, se mandaron muestras al Dr. Thomas Burr bacteriólogo de la Universidad de Cornell en Nueva York. El hizo aislamientos e inoculó bacterias en plantas sanas. También hizo observaciones de hojas enfermas en el microscopio electrónico.

C. Diseño experimental

Las plantas fueron colocadas en el invernadero siguiendo el diseño de parcelas divididas.

D. Manejo del experimento

Para sembrar las plantas a utilizar, se esterilizó la cama germinadora con bromuro de metilo (1.5 libras/metro cuadrado). A los cuatro días se procedió a sembrar semillas de cardamomo de las variedades Malabar y Mysoure. Se regó y aplicó fungicidas (apareció un hongo) cada tres días. Treinta días después de la siembra se transplantaron al lugar del almácigo. Se fertilizó con 15-15-15 dos veces, quince días después del transplante y con intervalos de veinte días. Luego se aplicó urea veinte días después de la última aplicación del triple quince. Se continuó con fertilización foliar cada veinte días, aplicación de fungicida cada quince y riego cada tres. Las plantas se trasladaron al invernadero a los seis meses de edad.

En el invernadero, se llenaron macetas y bolsas de dos litros de capacidad con una mezcla de tierra, materia orgánica y arena a razón de 2:1:1. Se esterilizó la tierra de las macetas y bolsas con bromuro de metilo. Se procedió luego a sembrar una planta en cada bolsa o maceta. Se efectuaron tres desbajeras y se fertilizó foliarmente cada quince días. Se aplicó urea dos veces y un fertilizante completo. El riego se hizo cada cuatro días y nunca se aplicó pesticidas a las plantas en el invernadero. Se empezó a trabajar con las plantas dos meses después de sembradas en el invernadero.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

La mancha foliar estudiada se conoce en el campo como "Cercóspora", es decir que se considera que el agente causante es un hongo del género *Cercospora*. Esto se le alude posiblemente porque las enfermedades causadas por los miembros de este género, generalmente son manchas foliares que se inician como manchas rojas o amarillas las cuales rápidamente se agrandan hasta tornarse de color gris-cenizo con una textura parecida a la de un papel. Luttmann (17) que describe una mancha foliar causada por *Cercospora sp.* dice que ésta se inicia como una mancha de color rojizo. En las muestras tratadas en el laboratorio se observó una mancha amarilla en su inicio, la cual se convierte en una mancha pardo claro con el centro osuro y un halo clorótico alrededor. La mancha que Luttmann (17) y otros autores describen finaliza con el mismo aspecto a lo que fue observado en el laboratorio. ANACAFE (11) que plantea la duda que la enfermedad sea causada por *Cercospora sp.* no menciona el halo clorótico.

Generalmente cuando el daño es causado por *Cercospora sp.* se observan conidios sobre la superficie de las hojas. Luttmann (17) menciona que éstos se observan en el haz de la hoja. En las muestras observadas en el laboratorio no se observaron conidios ni signos de otro hongo en el área de la mancha. Por esta razón, el halo clorótico característico de manchas bacterianas y el hecho que *Cercospora sp.* se ve favorecida por temperaturas altas y la mancha del cardamomo se ha observado con mayor incidencia después de heladas o en áreas frías, se considera que *Cercospora sp.* no es el agente causante sino una bacteria. Además se tenía referencia que la Dra. Ann Alvarez de la Universidad de Hawaii había aislado una bacteria.

En las cámaras de humedad para esporulación, apareció un hongo de micelio blanco, aproximadamente cinco días después del cultivo. Se cultivó el hongo y como una prueba interesante se inoculó e incubó pero no se obtuvo síntoma. Este fue el mismo hongo obtenido en los cultivos, pero todas las pruebas de patogenicidad dieron resultados negativos. El hongo se consideró como un posible agente secundario.

En todos los cultivos aeróbicos (excepto RFA) apareció una misma bacteria que será llamada "clave". También se obtuvieron otras bacterias las cuales se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Características de las bacterias aisladas en medios puros a nivel de laboratorio

Bacteria	Color	Textura	Bordes	Olor	Crecimiento
Clave	crema no-fluorescente	lisa	bien delimitados	desagradable	rápido ^a
A	blanco	lisa	difusos	no	rápido ^a
B	blanco	lisa	aserrados	no	rápido ^a
C	blanco	lisa	bien delimitados	no	rápido ^a
D	blanco	lisa	bien delimitados	no	rápido ^a

^a crecimiento rápido se refiere a que no se necesita lente de aumento para ver las colonias en menos de siete días.

El Dr. Burr aisló también la bacteria clave. El comenta que esta bacteria parece ser una *Enterobacter sp.* Observó también, que concentraciones altas de las bacterias clave se encontraban en toda el área de las hojas con mancha. Con el objeto de comprobar si la bacteria existía en plantas aparentemente sanas se hicieron cultivos de estas hojas, pero los resultados fueron negativos. Luego se hizo cultivo de hojas que previamente hubieran sido inoculadas con la bacteria clave, pero de nuevo los resultados fueron negativos.

Cuando se inoculó la mayoría de plantas, la temperatura ambiental bajó a aproximadamente 15 °C. Esto se consideró favorable para la incubación del patógeno. Después de inoculadas las plantas, se esperó ocho meses, sin embargo no se obtuvo síntoma. El Dr. Burr tampoco obtuvo síntoma en sus plantas.

Después de dos meses de la inoculación, cuando ya se había concluido que no aparecerían los síntomas se plantearon tres cuestiones:

Primera: si la bacteria clave no era el agente causante, se debía aislar el verdadero agente causante. Podría ser una bacteria difícil de aislar o fastidiosa. Con esta inquietud se preparó el agar de cardamomo pensando que la bacteria causante necesitaría de alguna sustancia presente en el cardamomo que no se encontraba en los medios de cultivo utilizados. En el agar de cardamomo se obtuvo únicamente la bacteria clave. Se presentó también la incógnita de que fuera anaeróbica. Sin embargo, en los cultivos anaeróbicos no se obtuvo colonias de bacterias.

Segunda: aunque la bacteria causante fuera difícil de aislar o los cultivos de laboratorio perdieran su virulencia, deberían de aparecer síntomas de la enfermedad si se inocularan directamente las manchas de hojas infectadas. Sin embargo, el resultado de esta prueba también fue negativo.

Tercera: si la bacteria clave era el agente causante pero no se le presentaron las condiciones óptimas para infectar a la planta y producir síntomas, debieran alterarse los factores externos pero continuar inoculando la misma bacteria. Podría ser que la edad de las plantas fuera un factor de importancia debido a que la enfermedad se observó en el campo generalmente en plantas adultas y no en la edad de las plantas con que se trabajó. Otros factores podrían ser la temperatura y la humedad. Para eliminar todas estas posibilidades y tener todos los factores externos a favor del or-

ganismo causante, se sugiere inocular plantas adultas en el campo en un área donde haya mancha foliar. Se deberá marcar exactamente el lugar en la hoja donde se inoculará la bacteria clave. Como se tiene la certeza que las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad pues la mancha foliar ya se encuentra naturalmente, la aparición de síntoma en los lugares inoculados y marcados en las hojas comprobará que la bacteria clave es el agente causante de la enfermedad.

Las lecturas en el espectrofotómetro se hicieron para tener una idea de la absorvancia a la que se había inoculado. Sería aconsejable hacer lecturas del inóculo que se llevaría al campo para tener una referencia en el caso de que aparezcan síntomas.

Para tener mayor humedad las cámaras de incubación deberían tener una brisa constante. Con esta inquietud se probó meter plantas en jaulas de gaza que se mojaban con agua, pero la gaza se secaba demasiado rápido y no mantenía la humedad.

Dentro de los métodos de inoculación utilizados, el que resultó ser el más rápido y cómodo, fue el de alfileres en la esponja. Este método permitía echar el inóculo simultáneamente que se hacía la lesión. Se recomienda para inocular en el campo. La técnica de inyección tenía el problema que debido al grosor de las nervaduras de la hoja, se hacía difícil inyectar. Los otros métodos eran más tardados.

El método más adecuado para aislar la bacteria clave fue el método de corte y rayado con éste. Este era rápido y se obtenían colonias bien diferenciadas.

La prueba de hongo y bacteria se hizo para ver la posibilidad de que ambos organismos intervinieran en la enfermedad. Los resultados fueron negativos.

Bajo las condiciones del experimento se rechaza la hipótesis que el causante de la mancha foliar sea una bacteria, sin embargo aún cabe la posibilidad que en el campo se afirme la hipótesis.

Y. CONCLUSIONES

1. Debido a la presencia del halo clorótico característico de manchas bacterianas en la lesión, ausencia de signos de hongo en las muestras estudiadas y la temperatura que propicia el desarrollo de la enfermedad se considera que el agente causante de la mancha foliar del cardamomo es una bacteria.

2. Bajo las condiciones del experimento no puede afirmarse que la bacteria clave aislada sea la causante de la mancha foliar. Sin embargo, variando los factores externos y utilizando la misma bacteria como inóculo, hay bastantes probabilidades de confirmar su patogenicidad.

BIBLIOGRAFIA

1. AGRIOS, G.N. Plant pathology. New York, Academic Press, 1978. 703 p. pp. 3-54, 435-503.
2. AMEZQUITA, M.O. Técnicas de producción utilizadas en el cultivo del cardamomo (*Elettaria cardamomum*), según tamaño de explotación agrícola en Alta Verapaz. Tesis de Ing. Agr. Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, 1978. 57 p.
3. BARTZ, J.A. Infiltration of tomatoes immersed at different temperatures to different depths in suspensions of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Plant Disease (USA) 66(4): 302-306. 1982.
4. BERGER, R.D. y BARTZ, J.A. Analysis of monocyclic pathosystems with *Erwinia-Lycopersicon* as the model. Phytopathology (USA) 72(4): 365-368. 1982.
5. BONILLA, O. Búsqueda de fuentes de resistencia y métodos de diagnóstico al virus del mosaico en cardamomo. Tesis de Ing. Agr. Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala, 1983. 66p.
6. DHANALAKSHMY, C. y LEELAVATHY, K.M. Leaf spot of cardamom caused by *Phaeotrichoconis crotalariae*. Abstracts on Tropical Agriculture (USA) 2(7): 95. 1976.
7. DIFCO. Manual de bacteriología. Madrid. 395 p. s.n.t.
8. EISENSMITH, S.P. et al. Effects of leaf age and inoculum concentration on infection of sour cherry by *Coccomyces hiemalis*. Phytopathology (USA) 72(5): 574-577. 1982.
9. GEORGE, M. et al. A bacterial blight disease of cardamom. Abstracts on Tropical Agriculture (USA) 3(1): 145. 1977.

10. GEORGE, M. y JAYASANKAR, N.P. Control of "Chenthai" (bacterial blight) disease of cardamom with penicillin. Abstracts on Tropical Agriculture (USA) 3 (8): 130-131. 1977.
11. GUATEMALA. ANACAFE. El cultivo del cardamomo. Guatemala. s.n.t.
12. GUATEMALA, BANCO DE. Informe económico. Abril-septiembre 1979. Guatemala, 1979. 68 p.
13. GUATEMALA. INSTITUTO TECNICO DE CAPACITACION Y PRODUCTIVIDAD. Manual del cultivo del cardamomo. Guatemala, 1981. 29 p.
14. GUATEMALA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y ALIMENTACION. Cultivo del cardamomo. Guatemala. s.t.f.
15. INDIA. MINISTRY OF FOREIGN TRADE. Cardamom Culture. Ernakulam, Cardamom Board. 20 p. s.f.
16. KENAGA, C.B. Principles of phytopathology. Indiana, Balt Publishers, 1974. 402 p. pp. 12-40.
17. LUTTMANN, N.T. El cardamomo y su cultivo. Guatemala, Litografías Modernas, 1985. 84 p.
18. MENENDEZ, C.E. Zonificación del virus del mosaico del cardamomo en Guatemala y su distribución en la planta de cardamomo (*Elettaria cardamomum*). Tesis de Ing. Agr. Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala, 1984. 62 p.
19. NAIDU, R. Morphology, parasitism and epidemiology of *Phyllosticta elettariae* Chowdhury causing nursery leaf spot disease of cardamom. Abstracts on Tropical Agriculture (USA) 5(3): 141. 1979.
20. NAIDU, R. Parasitism of *Darlucsa film* (Biv) Cast. on cardamom. Abstracts on Tropical Agriculture (USA) 5(3): 141. 1979.
21. NAIDU, R. Screening of cardamom varieties against *Sphaceloma* and *Cercospora* leaf spot diseases. Abstracts on Tropical Agriculture (USA) 5(3): 141-142. 1979.

22. NAMBIAR, M.C. *et al.* Diseases and pests on cardamom; a resume of research in India. Abstracts on Tropical Agriculture (USA) 2(12): 148. 1976.
23. NOE, J.P. y STARKEY, T.E. Relationship of apple fruit maturity and inoculum concentration to infection by *Glomerella cingulata*. Plant Disease (USA) 66(5): 379-381. 1982.
24. PELCZAR, M.J. y REID, R.D. Microbiology. New York, McGraw-Hill, 1972. 947 p. pp 50-139, 669-690.
25. REED, G.L. y STEVENSON, W.R. Methods for inoculating muskmelon with *Erwinia tracheiphila*. Plant Disease (USA) 66(9): 778-781. 1982.
26. SAMAYOA, J.C. y SUCHAND, G.J. Cardamom. California, 1977. 28 p. s.n.t.
27. SCHAAD, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Minnesota, The American Phytopathological Society, 1982. 72 p.
28. STREETS, R.B. The diagnosis of plant diseases. Arizona, The University of Arizona Press, 1978.
29. STROBEL, G.A. y MATHRE, D.E. Outlines of plant pathology. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1970. 465 p. pp. 73-87.
30. US. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. México, Limusa, 1980. v.1.
31. WILLIS, J.C. A dictionary of the flowering plants and ferns. 7th Ed. (Rev. by H.K. Airey Shaw). Cambridge Univ. Press. 1966.