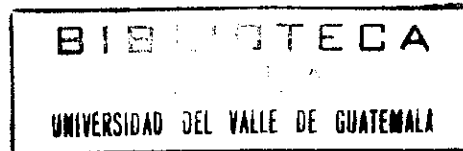


TRANSMISION DEL VIRUS DEL MOSAISO DEL CARDAMO-  
MO (VMCar) POR EL AFIDO Pentalonia nigronervosa Coq.  
(Homóptera: Aphididae) EN GUATEMALA

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



TRANSMISION DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL CARDAMO-  
MO (VMCar) POR EL AFIDO Pentalonia nigronervosa Coq.  
(Homóptera: Aphididae) EN GUATEMALA

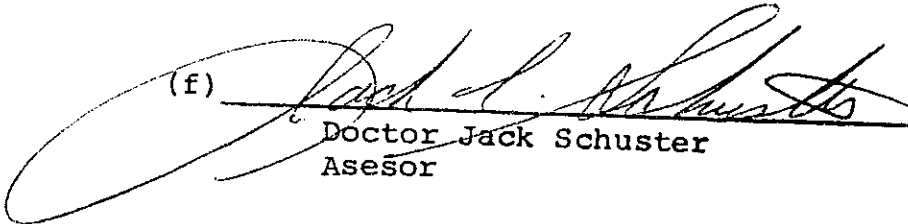
PATRICIA DE LEON COHEN

Trabajo de investigación presentado para op-  
tar al grado académico de Licenciatura en Bio-  
logía

Guatemala


1986

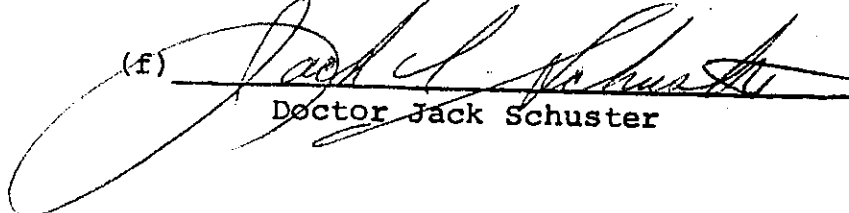
Vo.Bo. :

(f)   
Doctor Jack Schuster  
Aseñor

Tribunal:

(f)   
Doctora Margaret Dix

(f)   
Doctor Michael Dix

(f)   
Doctor Jack Schuster

Fecha de aprobación: 16 de Octubre de 1986.

A DIOS

A mi Patria Guatemala

A mis Padres: Edgar Ramiro de León López  
Sara Cohen de de León

Por su apoyo, cariño y comprensión.

A mis Hermanos: Lucrecia de León Cohen  
Ramiro de León Cohen

A mi familia con mucho cariño.

A la familia Wilhelm-Cohen, por brindarme cariño, confianza y un hogar.

A mis Profesores del Colegio "La Patria" de Quetzaltenango, y Catedráticos de la Universidad del Valle de Guatemala, especialmente a los Doctores Margaret y Michael Dix, Jack Schuster, Julio Tejada y Dennis Gonsalves.

A la Asociación de Productores de Cardamomo, por darme la oportunidad de realizar este estudio.

A Estuardo Ríos.

A todos los que colaboraron conmigo en la realización de este trabajo y en mis estudios Universitarios. Gracias.

## RESUMEN

En este trabajo fue estudiada la eficiencia de transmisión del VMCar por medio de Pentalonia nigronervosa en laboratorio y en campos de la costa sur de Guatemala. Para la inoculación se utilizaron grupos de 1, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 áfidos en estado adulto e inmaduro. Se colocaron sobre plantas de cardamomo con virus para que lo adquirieran durante 30 minutos y hasta 15 días. Luego se pasaron inmediatamente a plantas donde permanecieron 1, 2, 5 y 15 días en dos lugares: en la ciudad de Guatemala y en Santa María de Jesús, Quetzaltenango. Se inocularon en total 166 plantas de cardamomo sanas de las cuales ninguna resultó enferma. El virus se detectaba con la técnica serológica ELISA método directo.

No se logró transmitir el VMCar a cardamomo con el áfido Pentalonia nigronervosa, bajo las condiciones climáticas de la ciudad de Guatemala y de la Aldea de Santa María de Jesús, Quetzaltenango. Por lo tanto se concluyó que bajo estas circunstancias y condiciones ambientales este insecto no fue capaz de transmitir el virus, por lo tanto el virus no es persistente en el pulgón.

## CONTENIDO

		Páginas
I.	INTRODUCCION	1
II.	METODOLOGIA	10
	A. Cultivo y mantenimiento de las plantas de cardamomo	10
	B. Crianza y manipulación del áfido <u>Pentalonia nigronervosa</u> Coq.	13
	C. Análisis de muestras	15
	1. Sintomatología vegetativa del virus del mosaico del cardamomo (VMCar)	15
	2. Técnica serológica ELISA (Técnica inmunosorbente enzima conjugada) método directo, estandarizada por Diez (1982) para <u>Elettaria cardamomum</u>	16
	D. Porcentaje de eficiencia de transmisión del VMCar con el áfido <u>Pentalonia nigronervosa</u> Coq.	16
	1. Ensayos de transmisión del VMCar con <u>P. nigronervosa</u> Coq. incluyendo variables en tiempo de transmisión, ayuno y con incremento del número de áfidos	21
III	RESULTADOS	28
IV	DISCUSION	32
V	CONCLUSIONES	37
VI	LITERATURA CITADA	38
	APENDICES	
	A. Técnica serológica ELISA método directo estandarizada por Diez (1982)	40

para Elettaria cardamomum

- B. Datos climatológicos de temperatura, precipitación pluvial y humedad relativa de las fechas en que se realizaron las inoculaciones 44

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	Página
1. Importancia relativa de las exportaciones de cardamomo 1945-1981	3
2. Transmisión del Mosaico del cardamomo o "Katte" en la India por medio de 13 especies de áfidos	6
3. Resultados de distintos métodos de transmisión del VMCar con <u>P. nigronevosa</u> Coq. en la ciudad de Quetzaltenango y en la Aldea de Santa María de Jesús, Quetzaltenango.	30

Figura	
1. Esquema de la jaula para crianza de áfidos con una sección removible de tela	12
2. Hoja de datos por placa de la técnica ELISA	17
3. Diagrama de flujo de la secuencia de pasos, para conocer la eficiencia de transmisión del VMCar con <u>P. nigronevosa</u>	20
4. Secuencia de pasos de la técnica ELISA indirecta	43

## I. INTRODUCCION

El cardamomo (Elettaria cardamomum Maton (Zingiberaceae)) es una hierba perenne apreciada comercialmente por su fruto (Maistre, 1969). Las semillas del cardamomo ya casi no se emplean en medicina; antes eran muy empleadas como tónico estomacal, estimulantes y carminativos. Los usos del cardamomo varían según los países: en el Oriente Medio sirve para perfumar el café; en el Extremo Oriente entra en la preparación de los polvos de curry, la moscada de betel y las arecas; en Europa se usan en condimentos; en Suecia se usa particularmente en pastelería (Maistre, 1969). El aceite esencial se emplea en perfumería, para aromatizar los licores y en la preparación de tintes (Maistre, 1969).

En Guatemala se cultiva el cardamomo en el norte y en la zona sur-occidental. Su cultivo se inició a principios de siglo, estableciéndose las primeras plantaciones en el departamento de Alta Verapaz. Principalmente por razones de mercado, esta actividad no cobró importancia hasta la década de los cincuenta (Tabla 1). Cuando el precio del mercado mundial estimuló una mayor atención a las plantaciones existentes, se establecieron nuevas áreas de cultivo (Banco de Guatemala, 1979). A partir de 1959 las exportaciones aumentaron en importancia, llegando a ocupar en 1978, un tercer lugar entre los productos de exportación, después del café y el algodón (Banco de Guatemala, 1979).

En Guatemala, como en la India, se ha reportado que el cardamomo está siendo severamente atacado por un virus, con el resultado de baja productividad y la muerte de la planta. En ambos países dicha enfermedad manifiesta sintomatología vegetativa similar de mosaico, pero esto no nos asegura que sea el mismo virus.

En la India se notó que la producción de las plantaciones de cardamomo empezaron a declinar considerablemente. Esto se debió a años con períodos climáticos desfavorables y a la aparición de trips (Taeniothrips cardamomie Ramakrishna) como la mayor plaga y el mosaico ("Katte") como la más seria enfermedad (Abraham, 1957).

En Guatemala, Flores (1980) informó que una enfermedad, el mosaico, ya atacaba al cardamomo. Fue primeramente detectada en fincas del municipio de El Palmar, Quetzaltenango. Reconocimientos subsiguientes demostraron que la enfermedad estaba presente en fincas de Pueblo Nuevo, Suchitepéquez; Colón y Costa Cuca, Quetzaltenango; y Yepocapa, Chimaltenango. Flores informó que solamente un número limitado de pequeñas plantaciones de la Costa Sur no estaban infectadas. En la zona Norte se ha observado en pocas fincas, incluyendo Sabas y San Isidro y en el Valle del Ticario (Cano, 1981; Menéndez, 1984).

La producción del cardamomo en Guatemala tiene gran im-

TABLA 1. IMPORTANCIA RELATIVA DE LAS EXPORTACIONES DE CARDAMOMO, 1945-1981

(BANCO DE GUATEMALA, 1981).

AÑO	Valor FOB de las Exportaciones totales del País - Miles Q.	VALOR FOB DE LAS EXPORTACIONES DE CARDAMOMO			
		Miles de qq.	Miles de Q.	Precio medio Q/qq.	Participación Relativa (%) en el valor total de Exportación.
1945	30 436	0.9	41.8	46.44	0.137
1946	36 680	1.0	77.9	77.90	0.212
1947	52 034	1.0	88.3	88.30	0.170
1948	50 165	1.3	121.5	93.46	0.242
1949	63 235	1.6	96.7	60.44	0.153
1950	78 905	0.6	107.8	179.67	0.137
1951	84 251	0.4	89.5	223.75	0.106
1952	94 716	0.8	103.5	139.28	0.109
1953	99 588	0.5	47.4	94.80	0.047
1954	104 884	1.5	124.2	82.80	0.118
1955	107 120	1.5	212.0	141.33	0.198
1956	124 342	0.7	123.6	176.57	0.099
1957	116 379	1.9	368.2	193.79	0.316
1958	107 380	1.6	282.0	179.25	0.263
1959	107 373	3.3	512.7	155.36	0.477
1960	116 197	9.9	679.6	68.65	0.585
1961	114 407	5.2	576.1	110.79	0.503
1962	118 474	9.1	475.1	52.21	0.401
1963	154 133	8.3	874.0	105.30	0.567
1964	169 325	8.7	1045.4	120.16	0.617
1965	187 819	9.4	1540.9	163.93	0.820
1966	231 927	9.8	2356.3	240.44	1.016
1967	203 913	11.7	2365.7	202.20	1.160
1968	233 453	12.4	1890.4	152.45	0.810
1969	262 511	13.9	2548.7	183.36	0.971
1970	297 138	21.6	3900.0	180.56	1.312
1971	286 936	15.9	3400.0	213.84	1.185
1972	335 875	14.5	2300.0	158.52	0.685
1973	442 034	26.5	4600.0	173.58	1.041
1974	582 247	37.7	7981.7	211.72	1.371
1975	640 909	40.5	10108.1	249.58	1.577
1976	784 411	45.0	15479.0	343.98	1.973
1977	1 178 786	51.9	27318.8	526.37	2.317
1978	1 089 461	101.2	27368.8	270.44	2.512
1979	1 241 448	74.9	49217.7	657.00	3.965
1980	1 519 834	109.0	55595.5	510.05	3.658
1981	1 226 112	95.9	34314.9	357.82	2.799

portancia económica, no solo como ingreso al país por la exportación del producto, sino también por ser fuente de trabajo para numerosos Guatemaltecos (Banco de Guatemala, 1979). Esta enfermedad está ocasionando grandes pérdidas, ya que no existe ningún tratamiento ni preventivo, ni terapéutico. Si continúa extendiéndose esta enfermedad, es probable que en un corto tiempo no será ya rentable el cultivo del cardamomo, con los resultados negativos para la economía del país (Tejada, 1982).

Los virus son partículas infecciosas microscópicas que se multiplican sólo dentro de las células del huésped (N.A.S., 1978). Las plantas pueden ser susceptibles a uno o varios virus y éstos a veces han causado grandes pérdidas económicas (N.A.S., 1978). Las observaciones al microscopio electrónico muestran que algunas partículas virales tienen formas poliédricas, esféricas, cilíndricas, mientras otros son amorfos (N.A.S., 1978).

Después que una planta es infectada por un virus, no hay manera económica de curarla. Por lo tanto, los medios de control tienden a prevenir la infección por la eliminación de plantas hospederas del virus, controlar vectores, procreando variedades resistentes a la enfermedad y haciendo almá-cigos centralizados donde se asegure que la plántula estará libre del virus (N.A.S., 1978).

La transmisión de los virus se realiza en múltiples formas dependiendo de las características del virus en particular. La transmisión puede ser mecánica, por frotación de extracto de tejido enfermo en las superficies de las hojas sanas; por injerto y por propagación vegetativa de las plantas hospederas. También, se puede transmitir por medio de embriones infectados de las semillas. Pero, casi toda la diseminación de los virus en las plantas, desde la fuente del inóculo, la hacen los vectores biológicos, que incluyen ácaros, nemátodos, hongos e insectos (N.A.S., 1978).

Los más importantes insectos vectores son: pulgones, saltamontes, moscas blancas, trips, escarabajos y otros insectos masticadores. El insecto vector adquiere el virus al alimentarse de plantas enfermas, el virus puede persistir en el insecto y a veces multiplicarse, mientras en otros casos la relación virus-vector es efímera (N.A.S., 1978).

En la India se comprobó la naturaleza virulenta del mosaico indico del cardamomo, haciendo pruebas infecciosas usando el áfido Pentalonia nigronervosa Coq. (Uppal, et al., 1945; Varma y Capoor, 1958). Rao y Naidu (1973) demostraron que trece especies de áfidos eran capaces de transmitir el mosaico indico o "Katte", siendo P. nigronervosa el vector más efectivo (Tabla 2). Este último áfido requiere un período de alimentación de plantas infectadas de diez minu-

TABLA 2. Transmisión del Mosaico Indico del Cardamomo o "Katte" en la India por medio de 13 especies de áfidos (Rao y Naidu, 1973).

Especie de áfido	Número de plantas infectadas sobre número de plantas inoculadas
1. <u>Aphis craccivora</u>	31/50
2. <u>A. gossypii</u> (Cornelina strain)	43/50
3. <u>A. gossypii</u> (Bhendi strain)	23/50
4. <u>A. nerii</u>	35/50
5. <u>A. rumicis</u>	11/50
6. <u>Brachycaudus helichrysi</u>	12/50
7. <u>Greenidia artocarpi</u>	47/50
8. <u>Macrosiphum pisi</u>	49/50
9. <u>M. rosaefomis</u>	20/50
10. <u>M. sonchi</u>	18/50
11. <u>Pentalonia nigronervosa</u> f. <u>caladii</u>	50/50
(Caladium strain)	
12. <u>P. nigronervosa</u> (Banana strain)	45/50
13. <u>Schizaphis cyperi</u>	42/50
14. <u>S. graminum</u>	45/50

tos y es capaz de transmitir el virus en cinco minutos. El período de incubación del virus en el áfido es de aproximadamente una a una y media horas, deteniendo el virus de 24 a 48 horas (Varma y Capoor, 1958). Según Deshpande, et al. (1972), existe una correlación negativa entre el tamaño de la población del áfido y la propagación de la enfermedad.

Además de los estudios sobre transmisión por medio de áfidos se han hecho estudios en la India y en Guatemala sobre otros transmisores biológicos como hongos, nemátodos, trips, moscas blancas y jásidos y transmisión por semilla. Así mismo, probaron infectar plantas por medios mecánicos como injertos, frotación de extractos de plantas infectadas con VMCar y por cuchilla de corte. En ambos países solamente por medio de áfidos se pudo transmitir el mosaico del cardamomo (Uppal, et al., 1945; Dimitman, 1981; Hentze, (1982).

En estudios de reconocimientos de áreas cardamomeras se ha logrado determinar que hay plantas asintomáticas; sin embargo con la técnica ELISA se ha comprobado que son portadoras del virus. Por esta razón es indispensable utilizar otros criterios, además de la sintomatología, para conocer si una planta está infectada con VMCar o no.

En la India se han realizado numerosos estudios sobre la transmisión del "Katte" con áfidos, pero sus conclusiones

se basaron únicamente en la sintomatología. Estos trabajos nos pueden servir como una guía en el procedimiento de estudios semejantes, pero no como patrón fijo. Esto se debe a que en la India el cardamomo es una especie nativa, mientras que en Guatemala es una especie exótica; por esta razón el cardamomo guatemalteco tendrá interacciones con organismos diferentes, aunque crece en la misma zona ecológica y ocupe nichos ecológicos parecidos a los nichos de esta planta en la India.

En Guatemala, Dimitman (1981) en un abstracto, reportó que P. nigronevosa es un vector del VMCar, virus no persistente que adquiere en un período de una a una y media horas de alimentación de plantas enfermas. El áfido deja de ser infeccioso después de una hora de alimentación en plantas consecutivas. Las plantas infectadas muestran síntomas a los cuarenta a cuarenta y cinco días de la inoculación, pero Dimitman (1981) no incluyó detalles de sus experimentos. No se puede decir si las plantas con las que realizó sus pruebas estaban en realidad sanas o eran asintomáticas, por lo que se supone que utilizó como criterio solamente la manifestación de síntomas y no una técnica serológica.

Hentze (1982) hizo un estudio preliminar de la virosis del cardamomo y la transmisión de esta enfermedad por Pentalonia nigronevosa, pero trabajó solamente con cinco plantas.

Hentze (1982) no mencionó haber utilizado plantas control, ni haber probado serológicamente si las plantas que utilizó en su estudio estaban sanas.

Una enfermedad podría tener un gran número de vectores, pero lo que es realmente importante es la eficiencia del vector en transmitirla y también la efectividad del mismo, o sea cuántos organismos son necesarios para transmitirla y qué tanto tiempo requiere para inocularla. En las fincas cardamomeras del sur occidente de Guatemala, principalmente se ha observado P. nigronervosa sobre plantas de cardamomo, pero no se excluye la posibilidad que otros insectos puedan ser vectores del virus.

Las hipótesis a comprobar son que: (1) P. nigronervosa es capaz de transmitir el VMCar; (2) el virus del mosaico del cardamomo no es persistente en el áfido.

El objetivo de mi trabajo era determinar la eficiencia de transmisión del VMCar con P. nigronervosa y la persistencia del virus en el vector para poder recomendar medidas de control de este organismo. Se utilizó dos criterios de diagnóstico: la presencia de síntomas vegetativos y la técnica serológica ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent assay) método directo para el diagnóstico del virus.

## II. METODOLOGIA

### A. Cultivo y mantenimiento de las Plantas de Cardamomo.

Las plantas de cardamomo fueron traídas de un almácigo de la costa sur, donde estuvieron alejadas de la zona virosis y estuvieron constantemente vigiladas para evitar contaminación con el VMCar. Este almácigo tenía aproximadamente 300,000 plántulas de cardamomo.

Las que se escogieron de los semilleros del almácigo fueron homogéneas en cuanto a su altura (10 a 12 cm), número de hojas (2 a 4) y presencia de cogollo (hoja joven enrollada o empezándose a desenrollar). Las plantas seleccionadas se tomaron cuidadosamente de los semilleros, extrayéndolas con una buena porción de tierra en su raíz. Se colocaron en canastos en los cuales se transportaron a un invernadero de la Universidad del Valle de Guatemala, donde se realizaron los experimentos. Se transplantaron a macetas plásticas de 13 cm de altura, 8.5 cm de diámetro en la base y 14.5 cm de diámetro en la circunferencia superior, conteniendo tierra homogénea y esterilizada. La tierra era homogénea en cuanto a la porción de arena, arcilla y gallinaza (1:1:1 respectivamente). Se esterilizaron las macetas conteniendo tierra con bromuro de metilo para evitar contaminación con hongos, bacterias u otros patógenos. Las macetas conteniendo tierra se colocaron sobre el suelo, se cubrieron con plástico, sellándolo para

evitar fuga de bromuro de metilo, ya que es muy tóxico. Luego se le agregó el bromuro de metilo. Se cubrieron con plástico durante tres días; después se les quitó el plástico y se dejaron así durante otros tres días, para que se disminuyera su toxicidad. Luego, se procedió a sembrar las plantas de cardamomo en las macetas y se volvieron a seleccionar las más homogéneas a las dos semanas de transplante.

Estas plantas se cubrieron con cajas de armazón de madera de 1.5 metros de altura, 1 metro de largo y 0.75 metros de ancho, cubiertas con tela de algodón llamada pegón. El pegón nos ofreció las siguientes ventajas: es una tela delgada que deja pasar la luz, tiene pequeños agujeros de aproximadamente 0.2 mm de diámetro por donde puede pasar el aire pero no un áfido, y además es de bajo costo. Esta tela fue adherida a la armazón con tachuelas o grapas, dejando un espacio removible que funcionó como ventana para poder observar a las plantas y regarlas (Figura 1). El objeto de cubrir las plantas fue para tener un mejor control sobre estas y así evitar que algún insecto las infectara accidentalmente con el VMCar u otra enfermedad.

Inicialmente se trajeron 500 plantas de las cuales sobreviven el 80% aproximadamente. Se estuvieron trayendo consecutivamente más plantas, según fue el número de experimentos que se realizaron, teniéndose siempre una reserva de plantas. Se vigilaron constantemente estas plantas, pues era

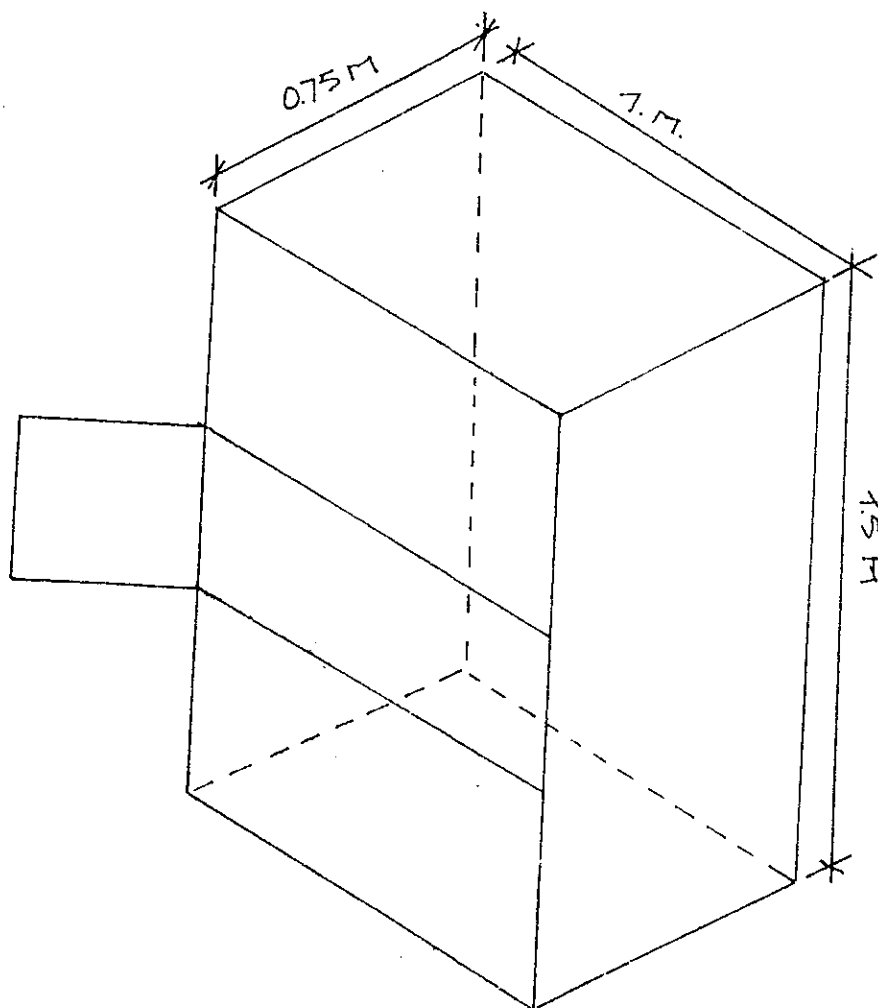


Figura 1. Esquema de la jaula para crianza de áfidos, con una sección removible de tela.

indispensable para empezar los experimentos que éstas se encontraran sanas, con buen crecimiento y lo más homogéneas posibles.

Cada planta fue identificada por un número escrito en una etiqueta plástica colocada en la maceta donde se encontraba.

Antes de iniciar cada experimento y al traer las plantas del almácigo, se les hizo la prueba serológica ELISA método directo, para asegurarnos que estuvieran sanas, libres del VMCar. Para ahorrar trabajo, tiempo y reactivos, se hicieron grupos de 25 plantas sacando un extracto de éstas, tomando para ello un pedacito de tejido de cada planta. Si el resultado obtenido de algún grupo fue positivo, se procedió a hacer extractos de cada planta integrante del grupo para conocer qué plantas estaban infectadas con el VMCar y se eliminaban.

B. Crianza y manipulación del áfido Pentalonia nigronervosa Coq.

Para la identificación de este organismo, se enviaron muestras de éstos al Doctor Boudreaux de la Universidad de Louisiana y al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos al Doctor Coulson, determinándolo como Pentalonia nigronervosa.

Los áfidos se criaron en cajas plásticas transparentes, conteniendo una maceta con planta de cardamomo, cuya tierra

estaba homogénea y esterilizada. Las plantas fueron diagnosticadas con la técnica serológica ELISA directa, para estar seguros que estuvieran libres del VMCar.

Los áfidos se trajeron de una plantación cardamomera de la costa sur y se alimentaron con hojas de cardamomo sano durante diez días. La hoja de cardamomo fue cambiada diariamente. Luego, se colocaron los áfidos sobre la planta de cardamomo, donde se criaron. Un mes después de haber colocado a los áfidos sobre la planta de cardamomo, se tomó una hoja de ésta y se le hizo la prueba ELISA directa, para conocer si la planta estaba sana o no. El objetivo de haber tenido una colonia de áfidos libres del VMCar fue para utilizarlos como control de los experimentos en que se utilizaron áfidos infectados con virus. Así se determinó si la alimentación de los áfidos en la planta alteraba los resultados.

Además de crianza de áfidos sin virus, se tuvo una crianza de áfidos, en las mismas condiciones, pero con la diferencia que los áfidos eran portadores del virus, pues se alimentaban de cardamomo con VMCar.

Se usaron seis plantas de cardamomo sano y seis plantas de cardamomo con VMCar confirmadas con ELISA. Cada planta se colocó en una caja de camisa. Se había observado anteriormente que cada planta de 20 cm de altura y con 4 a 6 hojas mantenía una población de aproximadamente 300 áfidos.

Los áfidos utilizados para los experimentos eran adultos

para facilitar su manejo y visibilidad, y ápteros ya que la población de áfidos alados era muy pequeña. Estos organismos fueron transportados de planta a planta con la ayuda de un pincel de cerdas finas para evitar dañar a los insectos.

Al principio, el cultivo de áfidos no fue exitoso, pues estos organismos eran atacados por ácaros y cubiertos de fumagina, lo cual mermaba la población. Estos problemas retardaron la ejecución de los distintos experimentos. La fumagina se combatió limpiando periódicamente las hojas de cardamomo de los residuos que dejaban los áfidos. Los ácaros aparecieron en mayor número y ocasionaban más daño a la población de pulgones en la época seca, por lo que aumenté la humedad regando constantemente las plantas. Con suficiente humedad, el daño ocasionado por los ácaros era mínimo, por lo que no se aspejaron las plantas con acaricidas pues podía matar a los áfidos.

Se tomaron datos de temperatura máxima, mínima y humedad relativa del día en que se hicieron las inoculaciones.

#### C. Análisis de muestras.

Las muestras de plantas se diagnosticaron utilizando dos criterios: presencia de sintomatología y la técnica serológica ELISA método directo.

#### 1. Sintomatología vegetativa del virus del Mosaico del Cardamomo (VMCar).

Una planta de cardamomo infectada con VMCar presentó en

sus hojas rayas paralelas de color verde claro sobre fondo verde, así formando el patrón característico del mosaico. La planta de cardamomo sano presentó sus hojas de color verde uniforme.

2 Técnica Serológica ELISA (Técnica inmunosorbente enzima-conjugada) método directo, estandarizada por Diez (1982) para Elettaria cardamomum.

Esta técnica nos permitió diagnosticar si una planta está infectada con VMCar, en dos días, de los cuales pocas horas se invirtieron en trabajo y el resto del tiempo en incubación. Además de la ventaja de conocer el resultado rápidamente, nos permitió probar 84 muestras y 12 controles por placa (Figura 2), utilizándose únicamente 0.2 ml. de extracto de planta por muestra.

La secuencia de los pasos de la técnica ELISA método directo y los reactivos empleados en su ejecución se presentan en el apéndice A.

D, Porcentaje de eficiencia de transmisión del VMCar con el áfido Pentalonia nigronervosa (Experimento 1)

Antes de iniciar los experimentos de transmisión del mosaico del cardamomo, se realizó un estudio piloto; éste consistió en colocar grupos de 20 áfidos sobre 20 plantas de cardamomo sano y dejarlos allí indefinidamente. Los áfidos provenían de plantas infectadas con VMCar en donde estos organismos vivían, mientras las plantas provenían de la costa sur

## DATOS DE LA PRUEBA ELISA

Prueba No. \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ Virus: \_\_\_\_\_  
 Bufer de cubrici3n \_\_\_\_\_ Conc: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_ Temp: \_\_\_\_\_  
 Prep. Ant3geno \_\_\_\_\_ Conc: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_ Temp: \_\_\_\_\_  
 Enzima conjugada \_\_\_\_\_ Conc: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_ Temp: \_\_\_\_\_  
 Sustrato, tipo: \_\_\_\_\_ Conc: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_ Temp: \_\_\_\_\_

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I												
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

II	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 2. Hoja de datos por placa de la t3cnica de ELISA. I: Distribuci3n de las muestras. II: Evaluaci3n visual y/o fotom3trica a 405 nm

en donde hay gran porcentaje de infección del virus del mosaico. Sin embargo, al hacer la prueba serológica ELISA método indirecto no se detectó el virus en las plantas. A las tres semanas de la inoculación, se hicieron extractos de las plantas y nuevamente se diagnosticaron con la técnica ELISA método indirecto. No se hicieron plantas control, en las que se debieron colocar áfidos libres del VMCar, pues se perseguía únicamente transmitir el virus.

Este trabajo piloto sugirió que este áfido si podía transmitir el mosaico del cardamomo. En las plantas inoculadas se detectó este virus, aunque se encontraba en baja concentración comparándola con una planta con virus que presentaba sintomatología vegetativa. Este trabajo por no tener control, se omitirá. Además, otras plantas del mismo lote de las que se hizo el experimento desarrollaron sintomatología de mosaico, después de más de un mes. Esto implica que posiblemente ya traían el virus.

Se decidió comprobar que este pulgón era un vector del VMCar y determinar qué tan eficiente era como vector.

La eficiencia de transmisión se definió como la facultad del áfido de transmitir el VMCar. Este se midió por determinar el porcentaje de todas las plantas inoculadas que porten el virus. Luego los áfidos se eliminaron asperjando las plantas con Malation y Metasystox. Este primer insecticida nos ofreció la ventaja que es de contacto por lo que los áfidos

expuestos quedarían eliminados inmediatamente; el segundo insecticida es sistémico y mataba a los áfidos que el malation no contactó y además era residual en la planta.

Se determinó la eficiencia de transmisión del VMCar (según figura 3) utilizando grupos de distintas cantidades de áfidos adultos: 20, 10, 5 y 1. Se trató de establecer si la eficiencia de transmisión dependía del número de áfidos que inoculan este virus o si un áfido era tan eficiente como 20 (figura 3 Experimento 1).

Los áfidos extraídos de plantas de cardamomo infectados con VMCar, se colocaron durante 24 horas sobre las plantas sanas de cardamomo, que tenían aproximadamente tres meses de edad.

Se hizo 20 réplicas de cada grupo de áfidos. Como control se utilizaron grupos de 20 áfidos provenientes de plantas de cardamomo libres del VMCar, cada grupo en una planta sana diferente (figura 3 Experimento 1).

Dos meses después de la inoculación, se les hizo la prueba ELISA directa a hojas de las plantas inoculadas. Se siguieron haciendo pruebas con ELISA método directo mensualmente, durante 17 meses después de la inoculación. Añadí un tiempo de ayuno, o sea un tiempo anterior a la adquisición del virus en que el áfido permaneció sin alimento. Este nuevo tiempo era para que el áfido estuviera hambriento al momento de colocarlo

PLANTA DE CARDAMOMO CON VMCar Y CON AFIDOS. PLANTA DE CARDAMOMO SANO Y CON AFIDOS

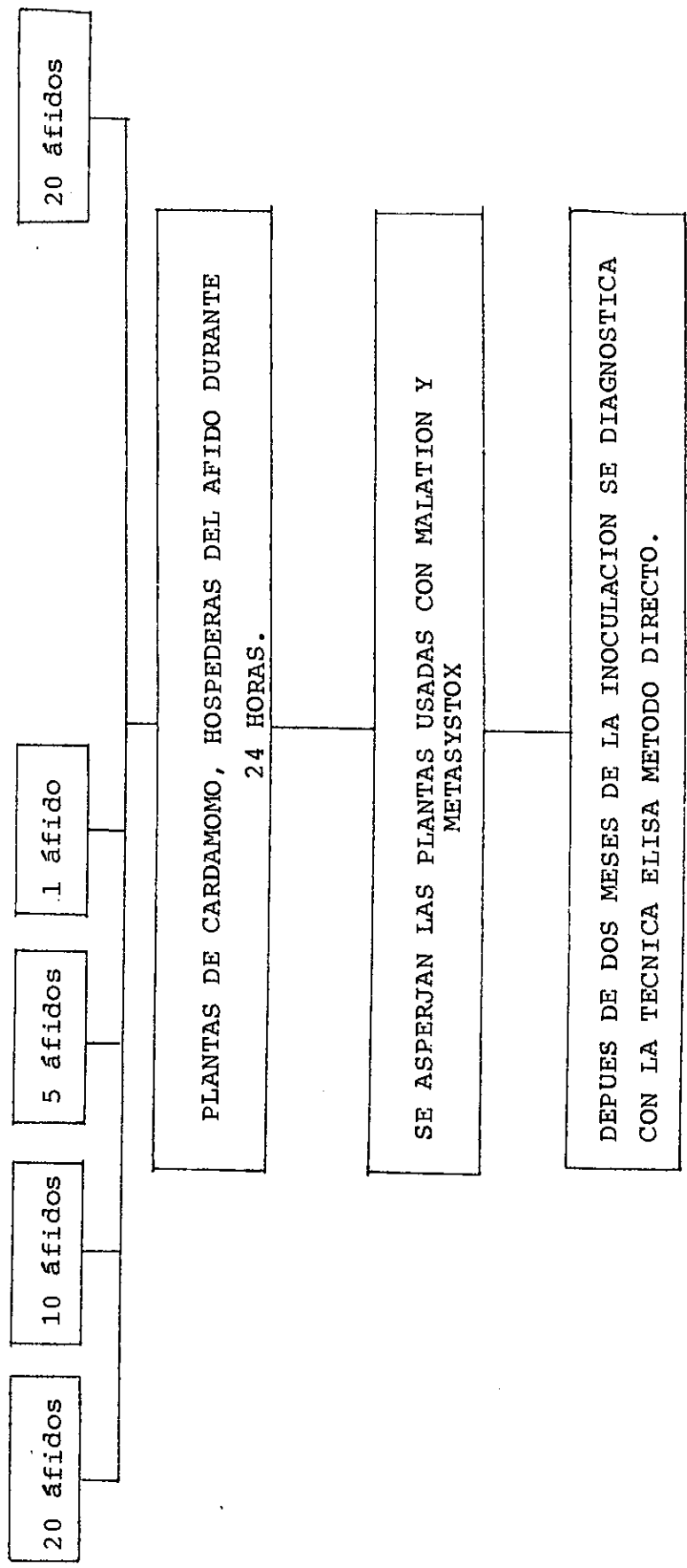


Figura 3. Diagrama de flujo de la secuencia de pasos para conocer la eficiencia de transmisión del VMCar con Pentalonia nigronervosa.

en la planta infectada con VMCar o sea durante el período de adquisición del virus. Como los resultados que se obtuvieron fueron negativos para la transmisión del VMCar, se probaron tiempos de adquisición y transmisión más prolongados.

El número de áfidos también se incrementó para que hubiera más probabilidad de transmisión. Los diferentes experimentos con los nuevos cambios se explicarán a continuación.

- 1 Ensayos de transmisión del VMCar con P. nigronervosa incluyendo variables en tiempos de transmisión, ayuno y con incremento del número de áfidos.

En esta nueva serie se quiso estudiar el impacto de aumentar el tiempo de inoculación, números grandes de áfidos y estadio de desarrollo del áfido sobre la transmisión. Anteriormente este tiempo era de un día; lo prolongué hasta cinco días para aumentar la probabilidad de inoculación.

Experimento 2. En este experimento se utilizaron tres grupos de áfidos de 20 individuos cada uno: un grupo de áfidos adultos provenientes de plantas de cardamomo sano los cuales sirvieron de controles; otro consistió de áfidos adultos ápteros provenientes de plantas de cardamomo con VMCar; y el tercer grupo consistió en diez áfidos adultos ápteros y diez áfidos ninfas provenientes de plantas de cardamomo con VMCar. Se hizo cinco réplicas por cada grupo de áfidos.

Un mes después de la inoculación se tomaron hojas de las plantas inoculadas y se les hizo la prueba ELISA método direc-

to para diagnosticarlas.

Experimento 2. Como se podrá notar en la tabla tres, en el experimento anterior como en los posteriores, se inocularon menos plantas (5) por tratamiento que en el primer experimento (20). Esto se hizo para poder realizar el mayor número de pruebas con distintas variables y que los pulgones con que se contaban fueran suficientes.

Experimento 3. Decidí hacer una réplica del experimento que realizó Rajan (1981) en la India, donde obtuvo éxito en la transmisión del "Katte" con Pentalonia nigronervosa, con modificación en el tiempo de transmisión que fue de dos días en lugar de una hora, ya que consideré que el tiempo de transmisión que él utilizó era muy corto. Además, si se podía transmitir el virus en un período tan corto, en el período tan largo debe poder hacerlo también. Él utilizó grupos de 15 a 20 áfidos para la inoculación de las plantas de cardamomo. A los áfidos los dejó sin alimento dos horas antes de la adquisición del virus, luego los colocó sobre la planta con "Katte" durante 30 minutos. Se inoculó siete plantas experimentales y tres plantas control.

Los controles tuvieron dos días con grupos de 20 áfidos adultos libres del VMCar.

Experimento 4. En este experimento se hicieron tres grupos de áfidos; un grupo de 30 áfidos adultos ápteros, provenientes de plantas de cardamomo sano, un grupo de áfidos adul-

tos ápteros provenientes de plantas de cardamomo con VMCar y el último grupo de 30 áfidos, de los cuales 15 eran áfidos adultos ápteros y los otros 15 eran ninfas, los cuales provenían de plantas de cardamomo con VMCar. Se inocularon dos plantas por grupo de áfidos y los áfidos permanecieron durante dos días.

En el experimento 4.1 se hizo una repetición del experimento 4 (ver tabla 3) en el que se utilizaron solamente dos plantas por grupo de áfidos. Debido a que el número de plantas utilizadas en experimento 4 era muy pequeño, se decidió hacer otras repeticiones (Experimento 4.1) con el mismo tratamiento. En este se utilizaron grupos de 30 áfidos ápteros, con dos días de inoculación. Se inocularon 4 plantas y se tuvieron dos controles. Al mes de la inoculación se les hizo la técnica ELISA a las plantas; durante seis meses se hizo esta técnica a intervalos de 30 días.

Experimento 5. Pocos días después de la última inoculación, se hizo otro experimento semejante al anterior (Experimento 4, ver Tabla 3), en el que también se usaron grupos de 30 áfidos para cada inoculación. El período de inoculación fue de cinco días. Se tuvieron cinco plantas expuestas al virus y tres plantas control y se probó con la técnica ELISA a un mes de la inoculación. Luego se repitió la prueba cada 30 días.

Ya que no se conseguía la transmisión del virus decidí

utilizar más áfidos.

Experimento 6. En este experimento se usaron grupos de 40 áfidos, adultos, ápteros, provenientes de plantas de cardamomo con VMCar. Se inocularon cuatro plantas durante 15 días. No se hicieron grupos control, pues se deseaba únicamente transmitir el virus y el número de áfidos libres de VMCar era muy pequeño.

Puesto que en la ciudad de Guatemala no logré transmitir el virus del mosaico del cardamomo se decidió intentar la transmisión en una zona cardamomera, que estuviera siendo atacada por el VMCar y que además tuviera altas poblaciones del pulgón, Pentalonia nigronervosa. Se supondría que en esta zona, por tener un clima más adecuado, tanto para el buen desarrollo de la planta de cardamomo como para el pulgón, el virus debe ser transmitido por éste en forma natural.

El lugar escogido para la ejecución de los experimentos fue Santa María de Jesús, aldea del departamento de Quezaltenango, en la finca "El Salto" ubicada en el kilómetro 201 de la carretera al Pacífico, a una altura de 1600 mts sobre el nivel del mar.

Se hizo un reconocimiento de la finca, para poder escoger cual era el lugar más adecuado para inocular y mantener las plantas durante los diversos experimentos. Anteriormente realicé unos trabajos de inoculación de cardamomo en otras fincas de la costa sur, pero varias veces se presentó el problema

que, tanto las jaulas de madera como la tela que las cubría, era robada, por lo cual fracasaban los experimentos. Entonces, dentro de la finca se escogió un lugar que estuviera cerca de la casa del caporal, persona quien colaboró en tener especial cuidado en que las armazones de madera, la tela y las plantas no fueran robadas.

Se llevaron a la finca las plantas de cardamomo sano, las cuales se mantuvieron dentro de las armazones de madera cubiertas de tela nylon para evitar la entrada de insectos que pudieran también ser vectores del VMCar.

Los áfidos utilizados se extrajeron de las plantas de cardamomo con mosaico que estaban en la finca al momento de la inoculación. Los áfidos que se colocaron en las plantas control se extrajeron de cardamomo sano, las cuales se mantenían en la ciudad de Quezaltenango.

Experimento 7. Se hicieron cuatro grupos de distintas cantidades de áfidos ápteros adultos, provenientes de plantas con VMCar como en el estudio de porcentaje de eficiencia de transmisión del VMCar, (Experimento 1). Estos grupos mantenían 5, 10, 15 y 20 áfidos. También se tenían grupos control, de 20 áfidos que provenían de plantas de cardamomo sano. Se inocularon 5 réplicas por grupo de áfidos, durante dos días. Cumplido el período de inoculación se asperjaron las plantas con malation y metasystox. En este momento se observó que habían muy pocos pulgones por planta, a veces hasta el 75% de

los individuos por planta habían desaparecido. Esto seguramente se debió a que en Santa María de Jesús casi todas las tardes llueve y en estudios sobre dinámica de población de este pulgón se observó que la lluvia es capaz de matarlos en grandes cantidades, dejando pequeñas poblaciones después de una lluvia (De León, P. 1986, no publicado).

Dos meses después de la inoculación, a las plantas se les hizo la prueba ELISA método directo.

El mismo día que se hicieron estas inoculaciones se colocaron cuatro plantas de cardamomo sano cerca de macollas de cardamomo con VMCar en las cuales habitaba P. nigronervosa y otros insectos que podrían ser vectores.

Experimento 8. Puesto que la lluvia pudo haber reducido el tiempo de inoculación, se decidió hacer otro experimento similar, en donde las plantas con pulgones estuvieran protegidas. El lugar escogido para la inoculación fue la casa de la finca.

Hice grupos de distintas cantidades de áfidos adultos apteros provenientes de plantas de cardamomo con VMCar de 20, 15, 5 y 1 individuo. También hice grupos de 20 áfidos para las plantas control, los cuales provienen de plantas de cardamomo sano. Por cada grupo hice tres réplicas.

Luego de cumplir el tiempo de la inoculación, se asperjaron las plantas con los insecticidas ya mencionados, y se sacaron las macetas al campo, donde se cubrieron con la armazón de madera revestida de tela, para evitar que entraran insectos

que también pudieran ser vectores del virus. Al mes de la inoculación de las plantas se les hizo la prueba ELISA método directo.

### III. RESULTADOS

En el estudio piloto, todas las plantas inoculadas se diagnosticaron enfermas con la técnica ELISA método indirecto. Las plantas inoculadas murieron debido a las condiciones ambientales inadecuadas del laboratorio. Por este motivo no fue posible observar la sintomatología del mosaico durante los tres meses que estuvieron en el laboratorio.

En la tabla 3 se presentan los resultados de las pruebas de eficiencia de transmisión del VMCar con P. nigronervosa.

En los experimentos de porcentajes de eficiencia de transmisión se colocaron áfidos en un total de 80 plantas de las cuales ninguna planta se infectó, este diagnóstico se hizo tanto con ELISA método directo, como por la ausencia de sintomatología, a intervalos de 30 días desde el día de la inoculación hasta 17 meses después de la misma. Las 20 plantas de control (con áfidos no infectados) quedaban sanas.

Los resultados con los diversos experimentos sobre la transmisión del virus fueron negativos. Las plantas inoculadas con diversos tiempos de adquisición e inoculación, distintas cantidades y estadios de áfidos, en dos climas distintos, fueron en total 166. Cada experimento, excepto uno, tuvo plantas control (ver tabla 3), se utilizaron en total 23 plantas,

y todas quedaron libres del mosaico del cardamomo.

Los datos climatológicos de las fechas en que se hicieron los distintos experimentos se presentan en el apéndice B. En estos días la temperatura máxima estuvo en un rango de 20.2°C a 29.2°C; la temperatura mínima entre 9.2°C y 16.4°C; la precipitación pluvial entre 0 y 60 mm<sup>3</sup> y la humedad relativa entre 32 y 100%. Los datos climatológicos de la ciudad capital no varían mucho entre sí, sin embargo la temperatura y la precipitación pluvial en Santa María de Jesús son más variables y con la mayor precipitación. Así que, se hicieron las inoculaciones en dos condiciones climáticas distintas, y los resultados fueron los mismos, no hubo transmisión del VMCar.

3. RESULTADOS DE DISTINTOS METODOS DE TRANSMISION DEL VMCar CON EL AFIDO Pentalonía nigronervosa Coq., EN LA CIUDAD DE GUATEMALA Y EN LA ALDEA DE SANTA MARIA DE JESUS, DEPARTAMENTO DE QUETZALTENANGO, DIAGNOSTICADO CON LA TECNICA SEROLOGICA ELISA METODO DIRECTO.

No. de Experimento	No. de áfidos/planta	No. de Plantas	Tiempo ayuno/horas	Tiempo en planta con VMCar (adquisición).	Tiempo en planta (inoculación en días)	Fecha y lugar de inoculación	Plantas infectadas/Plantas inocuadas.
Exp. 1	20	20	0	0	1	G. 12-IX-84	0/20
	20	20	0	N hasta A	1	G. 12-IX-84	0/20
	10	20	0	N hasta A	1	G. 12-IX-84	0/20
	5	20	0	N hasta A	1	G. 12-IX-84	0/20
	1	20	0	N hasta A	1	G. 12-IX-84	0/20
Exp. 2	20	5	0	0	5	G. 5-XII-84	0/5
	20	5	0	N hasta A	5	G. 5-XII-84	0/5
	*20	5	0	N hasta A	5	G. 5-XII-84	0/5
Exp. 3	20	3	2	0	2	G. 4-III-85	0/3
	20	7	2	30 minutos	2	G. 4-III-85	0/7
Exp. 4	30	2	0	0	2	G. 4-III-85	0/2
	30	2	0	N hasta A	2	G. 4-III-85	0/2
	*30	2	0	N hasta A	2	G. 4-III-85	0/2
Exp. 4.1	30	2	0	0	2	G. 13-III-85	0/2
	30	4	0	N hasta A	2	G. 13-III-85	0/4
Exp. 5	30	3	0	0	5	G. 7-III-85	0/3
	30	5	0	N hasta A	5	G. 7-III-85	0/5
Exp. 6	ε*40	4	0	N hasta A	15	G. 26-III-85	0/4
Exp. 7	20	5	0	0	2'	Q. 26-V-85	0/5
	20	5	0	N hasta A	2'	Q. 26-V-85	0/5
	15	5	0	N hasta A	2'	Q. 26-V-85	0/5
	10	5	0	N hasta A	2'	Q. 26-V-85	0/5
	5	5	0	N hasta A	2'	Q. 26-V-85	0/5

Continuación.....

No. de Ex perimento	No. de áfidos/Planta	No. de Plantas	Tiempo ayuno/horas	Tiempo en planta con VMCar (adquisición).	Tiempo en planta (inoculación en días)	Fecha y lugar de inoculación	Plantas infectadas/Plantas inoculadas.
Exp. 8	20	3	0	0	5	Q. 5-VI-85	0/3
	20	3	0	N hasta A	5	Q. 5-VI-85	0/3
	15	3	0	N hasta A	5	Q. 5-VI-85	0/3
	5	3	0	N hasta A	5	Q. 5-VI-85	0/3
	1	3	0	N hasta A	5	Q. 5-VI-85	0/3

ε= experimentos donde no se hicieron controles  
 \* se colocaron áfidos adultos ápteros y ninfas  
 Días ' = días en el campo y en época lluviosa  
 G.= Ciudad de Guatemala.

Q.= Santa María de Jesús, aldea del departamento de Quetzaltenango.  
 N hasta A= desde el nacimiento hasta estado adulto.

IV. DISCUSION

En Guatemala, los dos estudios (Dimitman, 1981; Hentze 1982) sobre la transmisión biológica, o sea por medio de vectores del VMCar, coinciden en que el áfido Pentalonia nigro-nervosa es vector del mosaico del cardamomo. En este trabajo lo que se deseaba descubrir era que tan eficiente era este organismo como vector, para poder estudiarlo e idear estrategias de control tan drásticas como fuera su eficiencia.

Hay que notar que, para aumentar la probabilidad de la transmisión del VMCar, utilicé tiempos de adquisición y transmisión del virus mayores a los que utilizaron los investigadores en Guatemala y del "Katte" en la India.

Varma, Capoor y otros autores, quienes han realizado trabajos sobre la transmisión del virus sugieren un período de latencia del virus en el vector. Este tiempo es el necesario para que la partícula viral se reproduzca en el vector. En mi trabajo no utilicé tiempos de latencia porque los áfidos estaban bastante tiempo sobre la planta sana y yo supuse que este podía ser el momento en que las partículas virales se reproduciesen en el organismo del vector.

Sin embargo, por la forma de la partícula viral, Gonsalves, quien purificó el VMCar, opina que este virus no es persistente (comunicación personal, 1985). El se refiere a que el virus no necesita tiempo de incubación, pues solamen-

te permanece en el aparato bucal del insecto y no llega más adentro a multiplicarse.

En el estudio piloto, diagnosticado con ELISA indirecto, las plantas de tres meses de edad resultaron enfermas, lo cual sugiere que los áfidos transmitieron el virus. Sin embargo, no fue posible reforzar esta conclusión con observaciones de sintomatología en las plantas inoculadas debido a que estas murieron.

Pocos meses después de haber traído el lote de plantas con las que se hizo el estudio piloto, el resto de éstas, que no se utilizaron y que se había mantenido en campos de la Universidad, manifestaron sintomatología vegetativa de mosaico. Esta observación sugiere que estas plantas ya traían el virus pero en tan baja concentración que la técnica serológica utilizada no lo pudo detectar y que un mes después de la inoculación, esta concentración ya era mayor y detectable por ELISA método directo. Por estos motivos, se descarta este experimento y se invalida por no tener controles.

Para los siguientes experimentos se trajo un lote nuevo de plantas de cardamomo, las cuales fueron traídas de almá-cigos libres de VMCar y áfidos y reproducidas por medio de semilla.

En el estudio en que se trató de determinar el porcenta-

je de eficiencia de transmisión del VMCar con P. nigronervosa (experimento I), las plantas se diagnosticaron con la técnica ELISA método directo, debido a que no se contaba con un reactivo esencial para ELISA método indirecto. Los resultados muestran que tanto uno como 20 áfidos son insuficientes para transmitir el virus con los tiempos de transmisión y adquisición ya mencionados, en condiciones ambientales de la ciudad de Guatemala en el mes de septiembre de 1984, a los 17 meses de la inoculación. Se podría pensar que no hay suficiente concentración del virus, ya que aún 40 áfidos pueden transportar muy poco material viroso en su estilete y quizás en la planta no se haya reproducido tanto que nos permita determinarlo con ELISA método directo o por sintomatología.

En el estudio piloto se utilizaron áfidos adultos ápteros para transmitir el virus, pero debido a que estuvieron bastante tiempo en las plantas para inocularlas, estos organismos se reprodujeron. Se supone que las crías no podían llevar el virus al nacer, porque este permanece sólo en las partes bucales del pulgón, si es un virus no persistente. Pero podría ser que las ninfas al alimentarse del mismo sitio donde sus padres inocularon, obtengan el virus. Luego, al volver a alimentarse en otra parte de la planta, ayudaron a la diseminación del virus a varias partes de la misma planta. Pensando en esta posibilidad, hice un experimento donde

se colocaron grupos de áfidos adultos ápteros y ninfas y, como control, áfidos adultos provenientes de plantas de cardamomo sano. El diagnóstico con ELISA directo y por las observaciones de síntomas fue que las plantas estaban sanas. Aún permanecen sanas, 15 meses después de la inoculación.

Las plantas que se colocaron cerca de las macollas de cardamomo con VMCar, para que P. nigronervosa u otro vector las infectara con este virus, aún permanecen sanas. Las plantas tienen pulgones que seguramente vinieron del cardamomo adyacente infectado con virus. Por este motivo se cree que es necesario más tiempo para que las plantas manifiesten algún síntoma de mosaico, pues lo más seguro es que ya algún insecto que estuvo en el cardamomo infectado también se haya alimentado de este cardamomo sano.

Después de realizar estas series de inoculaciones sin lograrse la transmisión del VMCar se podría dudar de la efectividad de este vector. Dimitman (1981) y Hentze (1982) lo probaron en Guatemala, pero a pesar de tomar en cuenta los tiempos de adquisición y de inoculación del virus que ellos probaron, no obtuve la transmisión del VMCar. Posiblemente el virus necesita más tiempo para reproducirse en la planta y ser lo suficiente numeroso para poderse detectar con ELISA directa y manifestar síntomas. Dimitman (1981) ha reportado que el tiempo necesario para que aparezca sintomatolo-

gía después del día de la inoculación es de 40 a 45 días. Se podría pensar que él inició sus experimentos con plantas asintomáticas y que, por algún cambio en condiciones ambientales, como por ejemplo, cambiarlas del campo a un invernadero, manifestaron la enfermedad. Pero se supone que ambos autores utilizaron plantas control para su experimento y si éstas no presentaron síntomas, sí fue exitosa la inoculación, pero ambos no mencionan el empleo de éstas. En el laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala frecuentemente son enviadas hojas de plantas de cardamomo para diagnosticarlas con ELISA. Se ha observado que en hojas que no presentan sintomatología, es decir que presentan coloración verde uniforme y buen desarrollo, se les ha detectado el virus.

En la serie de experimentos presentados en este estudio, se utilizaron un total de 166 plantas de cardamomo sanas para inocularlas con el virus; 3,233 áfidos adultos ápteros y 80 ninfas. De las 166 plantas inoculadas, solamente las primeras 20 resultaron enfermas, pero se duda que P. nigronervosa fuera el vector del virus.

Respecto a la eficiencia de transmisión mi experimento sugiere que es cero, bajo las condiciones ya indicadas.

## V. CONCLUSIONES

- El áfido Pentalonia nigronervosa aparentemente no es capaz de transmitir el virus del mosaico del cardamomo bajo las siguientes condiciones: utilizando grupos de 1, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 áfidos adultos ápteros (20 áfidos adultos ápteros y 20 ninfas); con períodos de adquisición del virus de 30 minutos o de 15 días; con períodos de transmisión de 1, 2, 5 o 15 días, utilizando plantas de cardamomo sano de tres meses de edad; en condiciones climáticas de la ciudad de Guatemala y la aldea de Santa María de Jesús, Quetzaltenango.
- Las plantas de cardamomo no presentaron sintomatología vegetativa aún después de 17 meses de inoculación, ni se ha detectado el virus con la técnica ELISA método directo.
- Debido a que no se pudo transmitir el VMCar con P. nigronervosa, bajo las condiciones ya indicadas, se considera que este áfido no es muy eficiente como vector del VMCar.
- Si al alimentarse el áfido de cardamomo con VMCar adquiere el virus, esta no es persistente pues el áfido no lo transmite al alimentarse en una nueva planta.

VI. LITERATURA CITADA

- Abraham, P. 1957. Now, better possibilities with cardamom. *The Planter's Chronicle*. India 52: 65-73.
- Banco de Guatemala. 1979. Informe económico, el cultivo de cardamomo en Guatemala. *Guatemala* 26: 1-40
- 1941-1982. Recopilación de datos de boletines informativos. Guatemala.
- Barnes, E. H. 1968. Atlas and manual of plant pathology. Meredith Corporation, New York. 336 pp
- Cano, M. 1981. El cultivo del cardamomo. Ministerio de Agricultura, DIGESA. Guatemala. 36 pp
- De León, P. 1986. Densidad de población de Pentalonia nigronervosa, vector del VMCar y de flores de cardamomo en finca cardamomera de Santa María de Jesús Quezaltenango, de Mayo 1985-1986. No publicado.
- Deshpande, R. S., C. Siddappaji y S. Viswanath. 1972. Epidemiological studies on "Katte" disease of cardamom (Elettaria cardamomum Maton). Mysore. *Journal of Agriculture Science*. 6(1): 4-9.
- Diez, M. 1982. Estandarización de la técnica enzima conjugada inmunosorbente ELISA en cardamomo. Tesis para la obtención de título de Ingeniero Agrónomo. Universidad del Valle de Guatemala. 57 pp (no publicado).
- Dimitman, J. E. 1981. An aphid transmitted virus of cardamom in Guatemala. *Phytopatology Abstracts* 71: 104.
- Dirección General de Estadística de Guatemala. 1941-1982. Recopilación de datos de Libros de exportación. Guatemala.
- Flores, M. A. 1980. El mosaico del cardamomo. Unidad de investigación. Asociación Nacional del Café, Guatemala 2(2): 15.
- Hentze, F. 1982. Estudio preliminar de la virosis del cardamomo. Tesis para la obtención de título de Ingeniero Agrónomo. USAC. Guatemala. 28 pp.
- Kado, C. I. y H. O. Agrawal. 1972. Principles and techniques in plant virology. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 688 pp.

- Maistre, J. 1969. Las plantas de especies. Editorial Blume, Barcelona. 272 pp.
- Menéndez, C. E. 1984. Zonificación del virus del mosaico del cardamomo en Guatemala y su distribución en la planta de cardamomo, (Elettaria cardamomum). Tesis para la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad del Valle de Guatemala.
- National Academy of Science. 1978. Desarrollo y control de las enfermedades. Vol. I. Editorial Limusa, México. 233 pp.
- Rao, D. G. y R. Naidu. 1973. Studies on "Katte" or "mosaic" disease or small cardamom. Journal of Plantation Crops 1 (Suplement): 129-136.
- Rajan, P. 1981. Biology of Pentalonia nigronervosa filicaladdi Vander Goot, vector of "Katte" disease of cardamom. Journal of Plantation Crops 9(1): 34-41.
- Sharma, D.C.; S. P. Raychaudhuri y S. P. Capoor. 1972. Count down on the cardamom viruses. Farmer and Parliament, Plant Virus Research. Diciembre 3: 13-15.
- Tarr, S. A. J. 1972. The principles of plant pathology. Winchester Press, New York. 632 pp.
- Tejada, J. R. 1982. La técnica inmunosorbente enzima conjugada en el diagnóstico del virus del mosaico del cardamomo. Revista Cafetalera 20 (219): 19-23.
- Uppal, B. N.; P. M. Varma y S. P. Capoor. 1945. A mosaic disease of cardamom. Current Science 14(8): 208-209.
- Varma, P. M. y S. P. Capoor. 1958. Mosaic disease of cardamom and its transmission by the banana aphid Pentalonia nigronervosa Coq. Indian Journal of Agriculture Science 28: 97-108.
- Varma, P. M. 1962. The banana aphid (Pentalonia nigronervosa Coq.) and the transmission of "Katte" disease of cardamom. Indian Phytopathology. 25: 1-10.

## APENDICE A

Técnica serológica ELISA método directo estandarizada por Diez (1982) para Elettaria cardamomum.

Los reactivos y las cantidades de los mismos para preparar las soluciones utilizadas en esta técnica son los siguientes:

Bufer de fosfatos o PBS (pH 7.4)

8.0 g NaCl

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

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

Aforarlo a 1 litro de agua destilada

0.2 g KCL

0.2 g  $\text{NaN}_3$

PBS-Tween

PBS más 0.5 ml de Tween 20 por litro

Bufer de bicarbonato (pH 9.6)

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

2.93 g  $\text{NaHCO}_3$

Aforarlo a 1 litro de agua destilada

0.20 g  $\text{NaN}_3$

Bufer de dietanolamina (pH 9.8)

97 ml dietanolamina

800 ml  $\cdot \text{H}_2\text{O}$

Aforarlo a 1 litro de agua destilada

0.2 g  $\text{NaN}_3$

HCL hasta llevar a pH 9.8

Secuencia de pasos para la realización de la Técnica ELISA directa:

Para la realización de la técnica ELISA método directo, se emplean bandejas descartables 'microtiter' de 12 por 8 cm, con 96 pocillos en "U" de polyetileno. En cada bandeja se colocan 84 muestras y 12 controles. En cada uno de los pocillos se colocan 0.2 ml de gama-globulina de conejo, antiviral del mosaico de cardamomo diluido a 5 mg/ml, en una solución de bufer de bicarbonato a pH 9.6. La bandeja con su contenido es incubada a 37°C durante cuatro horas. Después, la bandeja es lavada con una solución de bufer de PBS-Tween, cuatro veces con lapsos de tres minutos (paso 1, figura 4).

Seguidamente se agrega a cada uno de los pocillos 0.2 ml de dilución 1:25 al material a investigar, diluido en bufer de fosfatos a pH 7.4 con 2% de polivinilpirrolidona. Los 12 pocillos control sirven para evaluar el material sano, enfermo y la condición del bufer. La segunda incubación se realiza a 4°C durante toda la noche. Después del segundo período de incubación, la bandeja es lavada con PBS-Tween de igual forma que a la anterior (paso 2, figura 4).

Luego se le agrega a cada pocillo 0.2 ml de gama-globulina conjugada con la enzima fosfatasa alcalina y se incuba a 30°C durante 3 a 6 horas. Esta enzima se conjuga con la ga-

ma-globulina pues en el siguiente paso donde se le agrega sustrato, sí es que hay virus en el pocillo, esta enzima se une al sustrato dando una coloración amarilla que será indicadora de la presencia del virus. Nuevamente se lava la placa con PBS-Tween de igual forma que las anteriores (paso 3, Figura 4).

El último paso consiste en añadir 0.3 ml de sustrato fresco de 2-nitrofenil fosfato de bufer de dietanolamina a pH 9.8 a razón 0.67 mg/ml. Se deja a temperatura ambiente 15 minutos o hasta observar la reacción, o sea, hasta que se empiecen a colorear de amarillo los pocillos a los que se les agregó extracto de planta de cardamomo con virus. Se para la reacción con 0.05 ml de NaOH 3M por pocillo. Se practican las evaluaciones visuales y mediciones fotométricas a una longitud de onda de 405 nm, con el espectrofotómetro.

Para la anotación de los resultados y datos de la prueba ELISA se utilizaron hojas de datos como los de la figura 2.

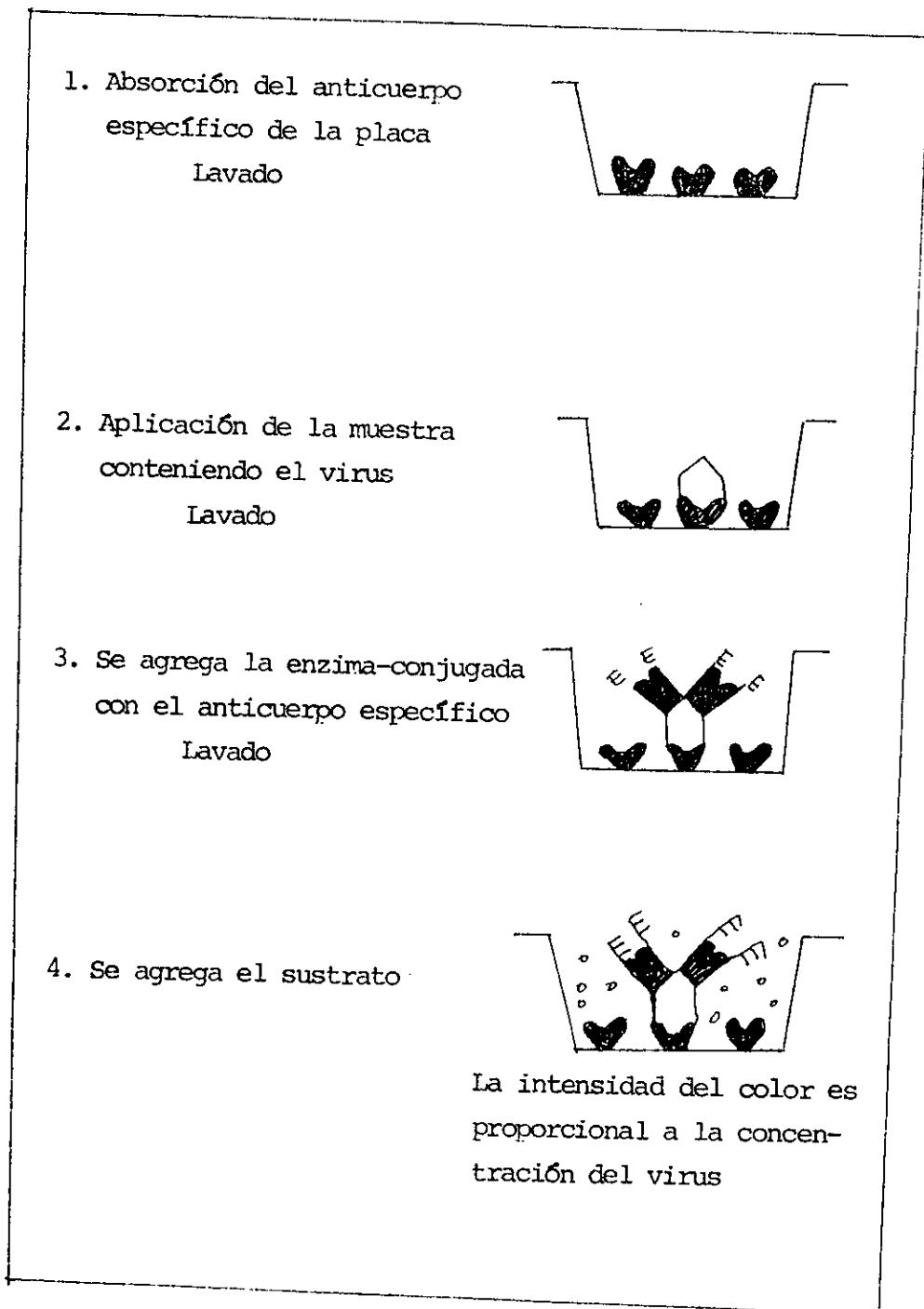


Figura 4. Secuencia de pasos de la Técnica ELISA directa.

## APENDICE B

Datos climatológicos de temperatura, precipitación fluvial y humedad relativa de la fecha en que se realizaron las inoculaciones del VMCar con el áfido Pentalonia nigronervosa en la Ciudad de Guatemala y en el municipio de Santa María de Jesús, Quetzaltenango.

Lugar y fecha de la inoculación	Temperatura en °C		Precipitación Pluvial en mm	Humedad relativa	
	Máxima	Mínima		Máxima	Mínima
Guatemala 5-XII-83	26.8	16.2	0.0	94	46
Guatemala 12-IX-84	23.6	14.5	2.0	100	45
Guatemala 5-XII-84	24.4	14.2	0.0	100	43
Guatemala 4-II-85	24.0	13.6	0.0	100	32
Guatemala 7-II-85	20.2	9.2	0.5	100	42
Guatemala 13-II-85	20.2	9.2	0.4	100	42
Guatemala 26-III-85	21.8	14.0	0.0	100	56
Santa Ma.-26-V-85 de Jesús	29.2	16.3	43.2		
Santa Ma. 5-VI-85 de Jesús	21.5	16.4	60.0		