

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 El cultivo de la lechuga	3
2.2 Enfermedades virales de la lechuga	4
2.2.1. Virus del mosaico de la lechuga (LMV)	4
2.2.1.1. Características generales	4
2.2.1.2. Sintomatología viral	5
2.2.1.3. Transmisión y vectores	5
2.2.1.4. Métodos de prevención	6
2.2.2. Virus del mosaico del pepino (CMV)	7
2.2.2.1. Características generales	7
2.2.2.2. Sintomatología viral	8
2.2.2.3. Transmisión y vectores	8
2.2.2.4. Métodos de prevención	9
2.2.3. Virus del cascabeleo del tabaco (TRV)	9
2.2.3.1. Características generales	9
2.2.3.2. Sintomatología viral	10
2.2.3.3. Transmisión y vectores	10
2.2.3.4. Métodos de prevención	11
2.2.4. Virus del bronceado del tomate (TSWV)	11
2.2.4.1. Características generales	11
2.2.4.2. Sintomatología viral	12
2.2.4.3. Transmisión y vectores	12
2.2.4.4. Métodos de prevención	13
2.3 Métodos de detección de virus en lechugas	13
2.3.1. Plantas indicadoras	13

2.3.2.	Metodología ELISA para detectar virus	14
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1.	Ubicación	16
3.2.	Muestreo de plantas	16
3.3.	Establecimiento de plantas	17
3.4.	Inoculación de plantas	17
3.5.	Prueba de DAS-ELISA	18
4.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	19
4.1.	Incidencia viral	19
4.2.	Detección de virus en lechugas	23
4.3.	Inoculación de plantas	24
5.	CONCLUSIONES	27
6.	RESUMEN	28
7.	ABSTRACT	29
8.	LITERATURA CITADA	30
	ANEXOS	33

1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de lechugas alcanza 18,75 millones de ton, siendo el principal productor China con ocho millones de ton, seguido por Estados Unidos con 4,5 millones de ton (EXPLORACIÓN DE MERCADOS, 2003). En Chile se plantan anualmente 5.400 hectáreas de lechugas (promedio 1995 a 2000) y se estima una producción anual de 300 millones de unidades, equivalentes a 75.000 ton (TAPIA y SALINAS, 2003).

Según el VI Censo Nacional Agropecuario (1997), 4.811 explotaciones agrícolas cultivan lechugas en el país, y entre las regiones V y Metropolitana se concentra el 74% de la superficie total (TAPIA y SALINAS, 2003).

En relación con el mercado externo los volúmenes exportados por Chile en el año 2001 corresponden a 278 ton, con retornos de U\$ 186.871. Estas cifras demuestran que la lechuga para exportación no se ha revelado como una alternativa para los productores. Sin embargo, presenta los mismos requisitos que disponen las grandes cadenas de supermercados en el país, con elevados niveles y estándares de producción, capacidad financiera, administrativa y logística (TAPIA y SALINAS, 2003).

Las enfermedades limitan de manera importante la producción de lechugas cuando no se dispone de cultivares resistentes. La naturaleza y frecuencia de estas enfermedades dependen de las condiciones locales donde se realicen los cultivos. La lechuga se ve afectada por casi 75 enfermedades (DAVIS *et al.*, 2002) y si bien aquellas causadas por virus son clasificadas como de importancia secundaria, en relación a otras enfermedades que la afectan, pueden llegar a producir pérdidas económicas de consideración, sobre todo en ataques tempranos (MAROTO; GOMEZ y BAIXAULI, 2000).

La V Región es la segunda zona más importante del país en producción de lechugas al aire libre (980 ha), y la primera bajo invernadero (15,3 ha), no existiendo hasta la fecha, ninguna referencia a nivel zonal ni nacional, de la presencia y/o distribución de enfermedades causadas por virus en este cultivo. Por lo tanto el objetivo de esta investigación es de generar información acerca de los diferentes virus que afectan a este cultivo en las provincias de Quillota y San Antonio.

Por las razones antes expuestas los objetivos de esta investigación fueron:

Evaluar la incidencia de la o las enfermedades virales presentes, en dos zonas de la V Región (Quillota y San Antonio), de acuerdo a sintomatología presente en plantas muestreadas.

Identificar, mediante la técnica DAS-ELISA y el uso de plantas indicadoras, la posible presencia de: Virus del mosaico de la lechuga (LMV), Virus del mosaico del pepino (CMV), Virus del cascabeleo del tabaco (TRV) y Virus del bronceado del tomate (TSWV), entre los meses de junio de 2003 a enero de 2004.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El cultivo de la lechuga:

Originaria de Asia menor, la lechuga (*Lactuca sativa* L.) pertenece a la familia Asteraceae y es una de las hortalizas más importantes dentro del grupo de vegetales de hoja que se consumen crudos en ensaladas (GIACONI Y ESCAFF, 1998).

Es una planta anual, autógena, presenta hojas redondeadas, lanceoladas o casi espatuladas. Su sistema radicular es profundo y poco ramificado, posee un tallo cilíndrico y ramificado y sus frutos presentan forma de aquenios provistos de un vilano plumoso (MAROTO, 1994).

Aunque existe un gran número de variedades cultivadas que se adaptan a una gama amplia de climas, en términos generales puede decirse que las lechugas prefieren climas templados y húmedos. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 15 – 20 °C. Además juega un rol importante en el acogollado. El excesivo calor puede producir la subida a flor prematura y un marcado sabor amargo en las hojas (MAROTO; GOMEZ y BAIXAULI, 2000).

En cuanto al suelo las lechugas se adaptan a una amplia gama, prefieren los terrenos francos y frescos que no retengan la humedad excesivamente, con abundante contenido de materia orgánica (MAROTO; GOMEZ y BAIXAULI, 2000).

La lechuga presenta una gran diversidad, dada principalmente por sus diferentes tipos de hojas y hábitos de crecimiento. Se agrupan en tres tipos bien definidos (GIACONI, ESCAFF, 1998):

- ❖ De hojas o de amarra (*Lactuca sativa* var. *Crispa*). Se distinguen dentro de este grupo variedades como, Gallega y Milanesa.
- ❖ De cabeza (*Lactuca sativa* var. *Capitata*). Dentro de este grupo se encuentran las variedades Trocadero y Great Lakes.
- ❖ Romanas (*Lactuca sativa* var. *Longifolia*). Se distinguen variedades como Blanca de Paris y Parris Island Cos.

2.2. Enfermedades virales de la lechuga:

2.2.1. Virus del mosaico de la lechuga (LMV)

2.2.1.1. Características generales

El mosaico de la lechuga es una de las enfermedades más corrientes y potencialmente perjudiciales de la lechuga (DAVIS *et al.*, 2002). La enfermedad fue descrita por primera vez hace 80 años por JAGGER (1921) (RYDER *et al.*, 2003), y se transformó en un problema económico serio mundialmente, debido principalmente a sus características de transmisión a través de las semillas (NEWHALL, 1923; citado por RYDER *et al.*, 2003). Todos los tipos de lechugas son susceptibles, incluidas las de amarra, romanas y mantecosas (DAVIS *et al.*, 2002).

El virus del mosaico de la lechuga pertenece a la familia Potyviridae, género potyvirus (TOMLINSON, 1982), posee partículas filamentosas que miden 13 nm de ancho por 750 nm de largo, contiene una molécula de RNA monocatenario de peso molecular aproximado de 3×10^6 Dalton. La proteína de la cápside está compuesta por un único polipéptido con un peso molecular de 33.000 Dalton (SMITH *et al.*, 1992).

Su distribución probablemente es mundial, presentándose en cualquier lugar donde se cultive lechuga (DAVIS *et al.*, 2002).

LMV infecta a 21 especies, pertenecientes a 21 familias (principalmente Asteraceae) y puede inocularse mecánicamente a 121 especies (SMITH *et al.*, 1992). También infecta a plantas de la familia Chenopodiaceae y malezas como *Senecio vulgaris*, *Capsella bursa – pastoris*, entre otras (APABLAZA, 2000).

2.2.1.2. Sintomatología viral

En las plantas jóvenes, las hojas de cotiledón se enrollan y la primera hoja verdadera presenta una forma irregular y levemente lobulada. Posteriormente aparece un aclareo de las venas y un bronceado en las hojas (OCAMB, 2003). En general los síntomas de moteado y mosaico son más pronunciados en cultivares de lechugas sin acogollar que en lechuga acogollada (DAVIS *et al.*, 2002). Junto a estos síntomas hay un importante retraso del crecimiento y un acogollado deficiente (MESSIAEN *et al.*, 1995). Por otro lado, las plantas infectadas en una fase posterior de su desarrollo evidencian un moteado verde pálido a amarillo. Las hojas exteriores desarrollan un rizado característico hacia abajo, constituyendo este el síntoma que mejor sirve para el diagnóstico en el caso de que el moteado desaparezca (DAVIS *et al.*, 2002).

El virus se mantiene bien en lechugas tardías y escalonadas en el tiempo. La enfermedad es frecuente en inviernos suaves como el de la zona central de Chile. El síntoma de mosaico se intensifica con temperaturas frías y húmedas, y la sintomatología se hace más evidente en plantas de semilleros (APABLAZA, 2000).

2.2.1.3. Transmisión y vectores

La fuente primaria de infección es la transmisión por semillas, la cual se estima en

un 3 – 10% (SMITH *et al.*, 1992), pudiendo causar serios problemas en campos de lechugas desde niveles de infección de un 0,1% (FLETCHER, 2003).

Una segunda fuente de transmisión son los pulgones, los cuales transmiten el virus en forma no persistente (Cuadro 1). Entre ellos se encuentran *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aphis gossypii* y *Acyrtosiphon pisum* (FLETCHER, 2003; SMITH *et al.*, 1992).

Myzus persicae es considerado el vector más importante de LMV. Éste se vuelve infectivo al alimentarse de hojas enfermas en sólo 15 segundos, lo puede transmitir de inmediato y perder esta capacidad rápidamente (APABLAZA, 2000). La fuerte actividad de los áfidos dentro de los campos puede tener como resultado un 100% de incidencia más tarde en la estación. Se considera que los hospederos alternativos son de importancia secundaria en la epidemiología de la enfermedad, pero pueden ser responsables de brotes localizados y de la invernación del virus (DAVIS *et al.*, 2002).

2.2.1.4. Métodos de prevención

En aquellos virus que se transmiten por semillas, como es el caso del LMV, el control está orientado básicamente al uso de semilla indexada libre de virus y/o al uso de cultivares resistentes (DAVIS *et al.*, 2002). En Estados Unidos desde hace 20 años se ha utilizado un programa de semilla indexada para asegurar que están libres de virus. Este programa se realiza muestreando lotes de semillas, a las cuales se les aplica el test de ELISA y si una de las semillas del lote está infectada el lote completo es rechazado. El programa de semilla indexada junto con la mantención de un periodo libre de lechugas, además de evitar la plantación de lechugas cerca de cultivos viejos han mantenido áreas de cultivos de lechugas, en Estados Unidos, casi libres de LMV (BAKER, 2003).

En Europa y Sudamérica, el mosaico de la lechuga es controlado mediante el uso de variedades resistentes como por ejemplo lechugas de amarra o de hoja y del tipo romana (DAVIS *et al.*, 2002).

El uso de insecticidas y la eliminación de malezas u otros hospederos del virus también ayudan a reducir la presión de éste en los cultivos de lechugas (FLETCHER, 2003).

CUADRO 1. Especies de áfidos y vectores de virus que afectan a lechuga y forma de transmisión de estos.

VIRUS	VECTOR	TRANSMISIÓN
LMV	<i>Myzus persicae</i> y <i>Aphis gossypii</i>	No persistente
CMV	<i>Myzus persicae</i> y <i>Aphis gossypii</i>	No persistente
TRV	<i>Paratrichodorus allius</i> , <i>Paratrichodorus nanus</i> ; <i>Trichodorus viruliferus</i>	Persistente
TSWV	<i>Frankliniella occidentalis</i>	Persistente

Fuente: BRUNT *et al.*, 2000

2.2.2. Virus del mosaico de pepino (CMV)

2.2.2.1. Características generales

El virus del mosaico del pepino pertenece a la familia Bromoviridae (BÜCHEN-OSMOND, 2003). Consta de partículas isométricas con un diámetro de 29 nm aproximadamente, tiene un genoma compuesto por tres segmentos de RNA monocatenario de sentido positivo que se encapsidan por separado (RNAs 1, 2 y 3 en sentido decreciente de peso molecular); también se encapsida por separado o con el RNA 3, un RNA subgenómico del RNA 3 (RNA 4) (FUCHS, *et al.*, 1996).

El virus del mosaico del pepino cuenta con gran número de hospederos a través de todo el mundo. Se reportan alrededor de 775 especies pertenecientes a 86 familias, en las que se encuentran especies cultivadas como hortalizas, plantas ornamentales y especies silvestres (SMITH *et al.*, 1992).

2.2.2.2. Sintomatología viral

Los síntomas en lechugas incluyen crecimiento raquítrico de las plantas, moteado amarillo, deformación y manchas necróticas en las hojas. Las plantas de lechuga acogollada infectadas en una fase temprana de crecimiento quedan, gravemente raquítricas y desarrollan cogollos pequeños. Los síntomas del mosaico del pepino pueden ser muy difíciles de diferenciar de los inducidos por el virus del mosaico de la lechuga (DAVIS *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque los síntomas del CMV se pueden confundir con los causados por LMV, el mosaico del pepino es más intenso y acompañado de una clorosis intervenal (ZITTER, 1984).

2.2.2.3. Transmisión y vectores

La fuente primaria de inóculo de las infecciones de CMV en lechugas son las malezas, plantas ornamentales y aquellas plantas de cultivos infectadas en las proximidades (DAVIS *et al.*, 2002).

CMV se transmite por áfidos en forma no persistente (Cuadro 1). Se han reportado alrededor de 75 especies capaces de transmitirlo, entre los más comunes encontramos: *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Aphis craccivora* y *Aphis fabae* (MARCHOUX, 1990; BLANCARD, 1990).

El áfido, al picar una planta infectada, resulta inmediatamente virulífero, es decir, puede inocularlo en menos de un minuto, permaneciendo en el vector por dos a tres horas (MARCHOUX, 1990; BLANCARD, 1990).

Por otro lado, se conocen algunas especies de malezas que llevan el virus en las semillas, como por ejemplo: *Stellaria media* y *Senecio vulgaris* (MESSIAEN *et al.*, 1995).

2.2.2.4. Métodos de prevención

La mayoría de las medidas de control que se adoptan son indirectas, basadas en disminuir la fuente de inóculo que puede estar tanto dentro como fuera del cultivo, limitar la dispersión del virus o reducir los efectos de la infección en los rendimientos del cultivo (MORIONES y LUIS, 1996).

En el caso del CMV este es un virus difícil de controlar, debido a que posee una amplia gama de hospederos y al modo no persistente de transmisión por insectos. En lechugas el control no se aplica debido a que el virus es un problema menor en el cultivo. Para impedir la introducción de CMV por áfidos en las nuevas plantaciones de lechuga, se debe evitar plantar cerca de campos viejos, o recién recolectados, de lechugas. También se debe evitar plantar cercano a cultivo de cucurbitáceas. Se han reportado aplicaciones de aceites minerales que interfieren en la transmisión del virus para disminuir la presión, pero se necesitan varias aplicaciones para conseguir un control adecuado (DAVIS *et al.*, 2002).

2.2.3. Virus del cascabeleo del tabaco (TRV)

2.2.3.1. Características generales

El virus del cascabeleo del tabaco es miembro del grupo de los tobamovirus, tiene viriones en forma de bastoncillos de dos longitudes (46 – 114 nm y 180 – 197 nm), cada uno de los cuales contiene RNA de cadena simple (genoma bipartito) (BRUNT *et al.*, 2000). Las partículas tienen un 5% de RNA de dos especies: RNA 1 (2.4×10^6 Dalton) y RNA 2 ($0.6 - 0.4 \times 10^6$ Dalton) (SMITH *et al.*, 1992).

TRV tiene amplio rango de hospederos, puede infectar a más de 400 especies monocotiledóneas y dicotiledóneas en más de 24 familias de plantas (DAVIS *et al.*, 2002; ROBINSON Y HARRISON, 1989).

Se distribuye geográficamente, en la región Euroasiática y en el continente americano (BRUNT *et al.*, 2000). La enfermedad es de escasa ocurrencia en lechuga, pero ha sido notificada en Estados Unidos (California), Dinamarca, Italia y Bangladesh (DAVIS *et al.*, 2002).

2.2.3.2. Sintomatología viral

Los síntomas que produce TRV van desde el enrollamiento o plegamiento de las hojas, colapso de las nervaduras, necrosis sistémica en el tabaco, moteado y mancha anular suberosa (dislocación) del tallo en la papa, hasta mancha anular y amarilla del ají, remolacha y otras plantas (AGRIOS, 1991). En las hojas de lechugas los síntomas varían de manchas amarillas y moteado amarillo a manchas anulares y dibujos lineales de color amarillo cromo brillante. Las plantas que se ven afectadas por el TRV pueden quedar raquíticas y desarrollar una apariencia aplanada (DAVIS *et al.*, 2002).

2.2.3.3. Transmisión y vectores

TRV es transmitido por nematodos de los géneros *Paratrichodorus* y *Trichodorus* (DAVIS *et al.*, 2002) como por ejemplo: *Paratrichodorus allius*, *Paratrichodorus nanus* y *Trichodorus viruliferus* (BRUNT *et al.*, 2000). El virus es adquirido en una hora, transmitido en una hora y retenido durante varios meses por el nematodo vector (Cuadro 1) (VAN HOOFF, 1970; citado por ROBINSON Y HARRISON, 1989). Aunque puede ser transmitido mecánicamente, no existe ninguna evidencia de transmisión del virus por contacto entre plantas (DAVIS *et al.*, 2002). Se transmite por semillas en algunos hospederos (40% en *Viola arvensis* o solo 1% en *Capsella bursa – pastoris*) (BRUNT *et al.*, 2000), además de malezas que pueden servir como

reservorios. No existe ningún informe de transmisión por semillas en lechugas (DAVIS *et al.*, 2002).

2.2.3.4. Métodos de prevención

TRV es un virus esencialmente de malezas, plantas ornamentales y silvestres (NOORDAM, 1956; COOPER y HARRISON, 1973; citados por ROBINSON y HARRISON, 1989)

Debido a que es una enfermedad menor de la lechuga, poco se sabe sobre resistencia genética. Las prácticas culturales normales que reducen o eliminan los vectores y los hospederos que sirven como reservorios deben limitar la propagación de la enfermedad, así como también la aplicación de nematicidas aplicados al suelo para reducir la presión de los nematodos vectores del virus (ROBINSON y HARRISON, 1989).

2.2.4. Virus del bronceado del tomate (TSWV)

2.2.4.1. Características generales

El virus del bronceado del tomate fue descrito por primera vez en Australia en 1919 y desde entonces se ha esparcido por todo el mundo (KUCHAREK, *et al.*, 2000). En Europa aparece por primera vez en 1931 y la expansión se relaciona con la introducción del trips *Frankliniella occidentalis*, el principal vector de este virus (GERMAN y HU, 1990).

Este virus pertenece a la familia Bunyaviridae, género Tospovirus (BRUNT *et al.*, 2000). Por microscopia electrónica se observa al virus TSWV con una forma esférica que tiene un diámetro entre 80 a 110 nm y delimitado por una membrana. Contiene cuatro proteínas estructurales y su genoma esta formado por tres ARN lineales de cadena simple: S ARN, N ARN y M ARN (DAVIS *et al.*, 2002).

Cuenta con un gran número de hospederos, más de 926 especies (CHATZIVASSILIOU *et al.*, 2000). Algunos de los cultivos que afecta éste virus son: lechuga, tomate, papayos; piña, alcachofas, apio y plantas ornamentales, todos estos se cultivan en condiciones ambientales muy variadas (GOLDBERG, 2000).

2.2.4.2. Sintomatología viral

En lechuga, las infecciones tempranas conducen con frecuencia a la muerte de la planta. En plantas viejas, el bronceado del tomate causa marchitamiento marginal, amarillamiento y punteado necrótico pardo en hojas y pecíolos (DAVIS *et al.*, 2002). Normalmente, la infección empieza en las hojas de un lado de la planta, que muestran clorosis, luego la decoloración se extiende a las hojas del cogollo y el crecimiento, se interrumpe en un lado de la planta (SMITH *et al.*, 1992). Los pecíolos y hojas internas más jóvenes de la planta, pueden exhibir numerosas y pequeñas manchas necróticas de color pardo claro o volverse oscuras y pudrirse como resultado de infecciones secundarias por bacterias que causan la pudrición (DAVIS *et al.*, 2002). Las lechugas tipo escarolas, tienden a abrirse sin llegar a formar una cabeza normal (LATORRE, 1995).

2.2.4.3. Transmisión y vectores

En condiciones naturales, la transmisión es de tipo persistente a través de vectores (Cuadro 1). TSWV es transmitido por varias especies de trips (Thysanoptera) de una manera circulativa – propagativa. El trips *Frankliniella occidentalis* es la especie vector más importante. La relación trips – TSWV es única entre las asociaciones virus - vegetal – vector, puesto que sólo las fases larvales son capaces de adquirir el virus (DAVIS *et al.*, 2002).

Las larvas, al alimentarse de tejidos infectados por 15 minutos o más, pueden adquirir el virus internamente (KUCHAREK *et al.*, 2000). Una vez que las larvas han

adquirido el virus, pueden transmitirlo al alimentarse de plantas sanas por el resto de su vida adulta (JONES, 2003).

Los adultos que ponen huevos en hospederos vegetales infectados con TSWV perpetúan el ciclo de la enfermedad, cuando las larvas emergen y adquieren el virus al alimentarse (DAVIS *et al.*, 2002).

2.2.4.4. Métodos de prevención

El control de TSWV es difícil, debido a la amplia gama de hospederos, los cuales incluyen plantas ornamentales y malezas, que permiten que el virus pase, exitosamente una temporada desde un cultivo a otro (GOLDBERG, 2000).

Se pueden utilizar varias estrategias culturales durante el periodo de cultivo como por ejemplo: la rotación con cultivos no susceptibles a la enfermedad, campos en barbecho para que los trips se dispersen hacia otras áreas, fumigación del suelo y uso de plántulas libre de virus (DAVIS *et al.*, 2002).

2.3. Métodos de detección de virus en lechugas:

2.3.1. Plantas indicadoras

Las plantas indicadoras presentan una sensibilidad específica a determinados virus, desarrollando síntomas característicos frente a la presencia de éstos (AGRIOS, 1991).

El traspaso a plantas sanas puede ser ejecutado de diferentes maneras, siendo una de ellas la trituración de hojas enfermas, a las cuales se les adiciona tampón fosfato para aumentar las reacciones o utilizar un extracto de virus purificados para inocular. Luego se generan heridas sobre la superficie de las hojas por medio de un

abrasivo como “carborundum” y con el jugo o extracto que contiene el virus se inoculan las plantas indicadoras (Cuadro 2) (AGRIOS, 1991).

CUADRO 2. Plantas indicadoras utilizadas para detectar la presencia de los principales virus presentes en lechuga y los síntomas que presentan.

VIRUS	PLANTA INDICADORA	SÍNTOMAS
LMV	<i>Chenopodium quinoa</i>	Mosaicos
CMV	<i>Chenopodium quinoa</i>	Lesiones locales y moteados
TRV	<i>Nicotiana tabacum</i>	Lesiones necróticas locales y manchas anilladas, necrosis sistémica, moteado
TSWV	<i>Nicotiana tabacum</i>	Lesiones necróticas locales seguidos por necrosis sistémicas y deformaciones de hojas

Fuente: BRUNT *et al.*, 2000

2.3.2. Metodología ELISA para detectar virus

Uno de los métodos que forma parte de las pruebas serológicas y que fue desarrollado a fines de la década de los 70 corresponde a la prueba de ELISA (Enzyme – Linked Inmuno Sorbent Assay), que corresponde a una prueba en donde el segundo anticuerpo se encuentra ligado a una enzima, la cual ha sido ampliamente utilizada por los fitopatólogos para detectar, estudiar con mayor precisión a los virus de las plantas y enfermedades que causan (AGRIOS, 1991).

El procedimiento común para la detección de virus de plantas ha sido el método directo de doble sándwich de anticuerpos (DAS-ELISA) en que son necesarios anticuerpos específicos del antígeno, marcados y sin conjugar. La enzima más utilizada para marcar el anticuerpo específico es la fosfatasa alcalina (CAMBRA, GORRIS y TERRADA, 1996; HILL, 1984).

Entre cada paso de DAS-ELISA, se debe realizar un riguroso lavado de las placas para remover trazas de reactivos que pueden causar reacciones no específicas que no son parte del complejo de sándwich de anticuerpos (HILL, 1984; CLARK y ADAMS, 1977).

Por lo general, son muestras positivas aquellas que tienen valores de absorbancia mayores a dos veces el promedio de los controles negativos (VALENZUELA, 1995; LOPEZ, 1994).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

Para cumplir con el objetivo propuesto, se realizaron prospecciones en un total de 20 predios con cultivo de lechuga en la V Región. En la provincia de Quillota se muestrearon 13 predios y los 7 restantes fueron muestreados en la provincia de San Antonio.

Los análisis virológicos fueron realizados en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, La Palma, Quillota, V Región.

3.2. Muestreo de plantas:

Se muestrearon al azar diferentes predios en la zona de Quillota y San Antonio, delimitándose en cada uno de ellos tres cuadrantes de 100 plantas cada uno, tomándose una muestra por cuadrante, resultando un total de 60 muestras de plantas de lechugas provenientes de los 20 predios elegidos para la prospección.

En cada cuadrante se evaluó la incidencia de plantas con síntomas de estar afectadas por virus, para esto se contaron las plantas que presentaban síntomas de mosaicos, moteados, enanismo, manchas necróticas o anillados, registrándose en una planilla los resultados (Anexo 1), a modo de determinar el porcentaje de incidencia de virosis. Luego se colectaron las plantas de cada cuadrante que presentaban síntomas visibles de virosis descritas en lechugas.

La incidencia se evaluó en porcentajes, utilizando para ello la siguiente formula:

$$\text{INCIDENCIA (I)} = \frac{\text{Número total de plantas con síntomas}}{\text{Número total de plantas observadas}} * 100$$

3.3. Establecimiento de plantas:

Se establecieron plantas de lechugas (Escarola, Milanese y Costina) e indicadoras (*Chenopodium quinoa* y *Nicotiana tabacum*) en un invernadero frío sin control de temperatura y aislado con mallas antiáfido para inocularlas con el extracto del virus de tal manera de poder complementar los resultados de la prueba de ELISA.

Las plantas de lechuga e indicadoras se sembraron en bandejas de almácigos, utilizando como sustrato una mezcla de turba y perlita. Posteriormente fueron transplantadas a macetas de 2 litros, las cuales contenían el mismo sustrato que las bandejas de siembra.

A todas las plantas de lechugas se les aplicó la prueba de ELISA para verificar la presencia o ausencia del virus del mosaico de la lechuga.

Se realizaron, manualmente, riegos dos a tres veces por semana y se fertilizaron las plantas con urea, nitrato de potasio, superfosfato triple y un fertilizante foliar. Además se aplicó Confidor (i.a. imidacloprid) para combatir mosquita blanca y Aliette (i.a. fosetil de aluminio) para el control de mildiú.

3.4. Inoculación de plantas:

Para la inoculación, se seleccionaron aquellas plantas provenientes de los distintos campos prospectados que resultaron positivas, mediante la prueba de ELISA, a un determinado virus.

A continuación se tomó un gramo de tejido y se trituró junto con 5 ml de solución tampón fosfato.

El extracto posteriormente se llevó al invernadero para proceder a la inoculación de las plantas de lechuga e indicadoras.

Luego, se procedió a la aplicación de “carborundum” para provocar microheridas sobre las hojas de las plantas, posteriormente se mojó el dedo pulgar con el extracto y se deslizó suavemente por el haz de la hoja desde el pecíolo hasta el ápice una sola vez. La hoja ya inoculada fue lavada con agua destilada para eliminar restos de carborundum.

Este proceso se repitió en cada planta que fue inoculada. Además, por cada planta se dejó una planta testigo.

3.5. Prueba de DAS-ELISA:

Las 60 muestras tomadas fueron llevadas al laboratorio manteniéndose refrigeradas hasta el momento de su análisis. Este periodo fluctuó entre 1 a 4 días, no presentando las lechugas síntomas de descomposición.

Las muestras obtenidas desde los diferentes predios, fueron sometidas a la prueba de ELISA con anticuerpos policlonales, BIOREBA y LOEWE, chequeándose la posible presencia de: Virus del mosaico de la lechuga (LMV), Virus del mosaico del pepino (CMV), virus del cascabeleo del tabaco (TRV) y el Virus del bronceado del tomate (TSWV). Para esta prueba se empleó el protocolo recomendado por las empresas proveedoras de los anticuerpos.

Las muestras correspondieron a hojas que presentaban sintomatología viral. Cada una fue pesada hasta completar un gramo de tejido. Siendo debidamente identificadas. Estos tejidos fueron cortados en trozos pequeños con bisturí para ser puestos en tubos de vidrio esterilizados. Se agregó el tampón de extracción (10 ml por muestra) y se utilizó un homogenizador (Polytron) hasta obtener una solución homogénea. El procedimiento DAS-ELISA empleado se detalla en Anexo 2.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Incidencia viral:

En la evaluación de la incidencia de enfermedades virales realizada en los predios prospectados en Quillota y San Antonio, se determinó que en todos estos predios fue posible observar sintomatología asociada a enfermedades virales.

En la zona de Quillota y San Antonio, en todos los cultivos observados, se visualizó la presencia de lechugas con síntomas de mosaico, encarrujamiento de hojas y enanismo. Sin embargo, en algunas ocasiones estos síntomas fueron difíciles de observar, especialmente en el caso de las lechugas tipo escarolas. Esto coincide con lo descrito por DAVIS *et al.* (2002) para el virus del mosaico de la lechuga (FIGURA 1A y 1B).

Si bien la determinación de la incidencia de LMV realizada mediante la observación de síntomas es un procedimiento muy subjetivo, que podría estar sujeto a errores, puede considerarse un método fiable en este estudio, debido a que fue el único virus detectado mediante DAS-ELISA.

Los resultados de incidencia del LMV reflejaron que en predios de la provincia de Quillota el porcentaje de incidencia viral, varió entre 7,0% a 31,0% con un promedio de 19,8% (Cuadro 3), en predios de la provincia de San Antonio el porcentaje de incidencia viral varió entre 6,3% a 41,0% con un promedio de 21,3% (Cuadro 4).

En general, es conocido que el virus del mosaico de la lechuga es transmitido por semilla, con valores fluctuantes entre 3 – 10% (DAVIS *et al.*, 2002). Considerando estos antecedentes, es posible inferir que en la mayoría de los predios analizados, el virus tuvo una dispersión por áfidos.



FIGURA 1A. Síntomas de mosaico encarrujamiento de hojas y enanismo en planta de lechuga milanesa afectada por LMV. Quillota septiembre 2003.



FIGURA 1B. Síntomas de mosaico leve, encarrujamiento de hojas y menor crecimiento en lechuga costina. Quillota septiembre 2003.

CUADRO 3. Porcentajes de incidencia viral del virus del mosaico de la lechuga, según sintomatología, para la zona de Quillota.

			FECHAS DE MUESTREO												
			05-06-2003			19-08-2003			23-09-2003			07-10-2003			
			Cuadrantes			Cuadrantes			Cuadrantes			Cuadrantes			
Predios	Localidad	Variedades	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	PROMEDIO
1	San Pedro	Escarola	15	16	13										14,7
2	San Pedro	Milanese				21	38	15							24,7
3	Las Garzas	Escarola				12	10	10							10,7
4	San Pedro	Escarola				12	13	10							11,7
5	San Pedro	Milanese							29	12	16				19,0
6	San Pedro	Milanese							30	29	21				26,7
7	Pueblo Indio	Milanese							17	22	24				21,0
8	San Pedro	Milanese							24	23	12				19,7
9	San Pedro	Española							36	32	25				31,0
10	San Pedro	Chilena							22	16	28				22,0
11	La Palma	Milanese										28	25	11	21,3
12	San Pedro	Costina							10	8	3				7,0
13	San Pedro	Milanese							17	21	48				28,7
PROMEDIO															19,8
MAX															31,0
MIN															7,0

CUADRO 4. Porcentajes de incidencia viral del virus del mosaico de la lechuga, según sintomatología, para la zona de San Antonio.

			FECHAS DE MUESTREO			
			20-01-2004			
			Cuadrantes			
Predios	Localidad	Variedades	1	2	3	PROMEDIO
1	Lo Abarca	Costina	11	14	17	14,0
2	Llolleo	Costina	22	20	24	22,0
3	Llolleo	Costina	28	35	31	31,3
4	Lo Abarca	Costina	10	8	6	8,0
5	Lo Abarca	Milanese	30	22	28	26,7
6	Lo Abarca	Piramide	8	5	6	6,3
7	Lo Zarate	Milanese	39	43	41	41,0
PROMEDIO						21,3
MAX						41,0
MIN						6,3

Los síntomas característicos del virus del mosaico del pepino no fueron observados en los diferentes campos muestreados en la zona de Quillota y San Antonio. Aún cuando los síntomas son muy similares a los del virus del mosaico de la lechuga no se observaron los mosaicos más intensos ni la clorosis intervenal característica de

este virus (ZITTER, 1984). Esto coincidió con los resultados arrojados por la prueba de DAS-ELISA.

La ausencia del CMV probablemente se debió a que en las fechas de muestreo en la zona de Quillota, el virus no se encontraba en las malezas o en los cultivos hortícolas, fuentes primarias de inóculo, que estaban cercanos a los predios de lechugas y por lo tanto los áfidos no podían transmitir el virus. Estudios realizados en Costa Rica por HORD *et al.* (2001) señalan que la incidencia viral del CMV es mayor, sobre todo en la estación seca de ese país, cuando las poblaciones de áfidos son más numerosas y el virus está presente en los hospederos principales cercanos al cultivo.

En lo que respecta al muestreo realizado en San Antonio, la ausencia de CMV puede deberse a que las zonas muestreadas eran en su mayoría áreas de cultivos exclusivos de lechugas, que presentaban un muy buen control de malezas por lo que no existirían fuentes de inóculo para los áfidos.

En cuanto al virus del cascabeleo del tabaco, los síntomas característicos de este virus no se observaron en ninguno de los predios prospectados durante este estudio, lo que coincide con los resultados revelados por la técnica de DAS-ELISA. Es importante señalar que este virus no se encuentra descrito en el país (APABLAZA, 2000). Además, como lo señalan ROBINSON y HARRISON (1989), TRV es esencialmente un virus de malezas, plantas ornamentales y silvestres.

Por último en lo que respecta al virus del bronceado del tomate, los estudios de incidencia viral no arrojaron resultados positivos en los predios prospectados, lo cual puede estar directamente relacionado con la ausencia de su vector principal, el trips *Frankliniella occidentalis* que disemina el virus en épocas calurosas que es cuando las poblaciones del insecto son más numerosas (JONES, 2003).

4.2. Detección de virus en lechugas:

Es importante señalar que los anticuerpos empleados para la detección de los diferentes virus eran todos policlonales, es decir, anticuerpos que se caracterizan por detectar las diferentes razas que poseen los virus.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante la prueba de DAS-ELISA se observó que el único virus presente en las plantas, fue el virus del mosaico de la lechuga (LMV). En lo que respecta a este virus, los análisis realizados demostraron que al menos una muestra de cada uno de los predios prospectados fue positiva a la prueba de ELISA (Cuadro 5). Esto concuerda con la sintomatología descrita, para este virus, por DAVIS *et al.* (2002).

En cuanto al virus del mosaico del pepino, todas las muestras provenientes de las dos zonas prospectadas, sometidas a la prueba de ELISA, resultaron negativas a este virus, a pesar de que en algunos predios se observó la presencia malezas y pulgones que pueden transmitir la enfermedad (Cuadro 5).

Para el caso del virus del cascabeleo del tabaco, los resultados obtenidos señalan la ausencia de estos virus en las muestras analizadas, tanto aquellas provenientes de Quillota como las de San Antonio (Cuadro 5).

En el análisis del virus del bronceado del tomate, las muestras sometidas a la prueba de ELISA arrojaron resultados negativos. A pesar de que una muestra proveniente de la zona de lo Abarca en San Antonio, presentaba síntomas de marchitamiento marginal, amarillamiento, punteado necrótico pardo en hojas y pecíolos (DAVIS *et al.*, 2002), pero luego de ser analizada resultó ser negativa a la presencia del TSWV y negativa a la presencia de LMV (Cuadro 5).

4.3. Inoculación de plantas:

La inoculación se realizó en plantas de lechugas e indicadoras (*Chenopodium quinoa*) aparentemente sanas con cuatro a cinco hojas verdaderas de crecimiento, eligiendo las hojas al azar.

Debido a que el único virus que se transmite por semilla en lechugas es el LMV (DAVIS *et al.*, 2002), se testaron las plantas a inocular mediante la técnica de DAS-ELISA, resultando todas negativas.

Para la inoculación propiamente tal y luego de obtener los resultados positivos de la prueba de ELISA, se procedió a inocular las plantas con aislados de LMV detectados.

Se efectuó una primera inoculación, en aquellas plantas que se mantuvieron en el invernadero sellado y provisto de malla antiáfido, además de una malla raschel sobre el techo de éste. No se observaron síntomas significativos de LMV en las plantas inoculadas de lechugas e indicadoras.

El periodo en que se mantuvieron las plantas inoculadas, se caracterizó por presentar temperaturas altas (sobre 30° C) al interior del invernadero, debido a que este se encontraba completamente sellado no permitiendo ningún tipo de ventilación. El efecto de la temperatura sobre las plantas enfermas aún no está muy claro, pero se sabe que la temperatura alta reduce la replicación en muchos virus de plantas y además la termoterapia es utilizada para obtener partes de plantas que estén libres de virus (SPIEGEL, FRISON y CONVERSE, 1993).

CUADRO 5. Resultado de las muestras sometidas a la prueba de ELISA.

Predios	Localidad	Variedades	RESULTADOS PRUEBA DE ELISA											
			CMV			LMV			TRV			TSWV		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	San Pedro	Escarola	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	San Pedro	Escarola	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Las Garzas	Escarola	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4	San Pedro	Milanesa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	San Pedro	Milanesa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	San Pedro	Milanesa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Pueblo Indio	Milanesa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	San Pedro	Milanesa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
9	La Palma	Milanesa	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
10	La Palma	Milanesa	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
11	La Palma	Chilena	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
12	San Pedro	Costina	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
13	San Pedro	Española	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14	Lo Abarca	Costina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Llolleo	Costina	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
16	Llolleo	Costina	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
17	Lo Abarca	Costina	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
18	Lo Abarca	Milanesa	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
19	Lo Abarca	Piramide	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
20	Lo Zarate	Milanesa	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Una segunda inoculación se realizó en el mes de enero de 2004, esta vez las plantas se mantuvieron en un recinto, el cual estaba rodeado por una malla antiáfido además de una malla raschel sobre el techo. Todo esto contribuyó a mantener una temperatura entre 20 a 25 °C en el interior y permitió que las plantas no sufrieran ningún tipo de estrés debido a las altas temperaturas del verano.

El virus LMV se inoculó mecánicamente desde lechugas infectadas, provenientes de San Antonio, a plantas de lechugas y de *Chenopodium quinoa*. Las plantas de lechugas no mostraron síntomas de mosaicos claros, solamente mostraron síntomas de encarrujamiento 15 días después. En las plantas de *Chenopodium quinoa* se observaron mosaicos en las hojas 15 días después de ser inoculadas.

Mediante la prueba ELISA, se corroboró que LMV se logró transmitir sólo a una plantas de *Chenopodium quinoa*, la que manifestó los mismos síntomas descritos en la literatura.

Por otro lado, las plantas de lechugas no resultaron positivas a la prueba, esto pudo deberse a que las microheridas provocadas por el carborundum no fueron suficientes para transmitir el virus o la cantidad de extracto no fue la apropiada. Por lo tanto, se debe revisar el procedimiento utilizado para la inoculación.

5. CONCLUSIONES

En este estudio preliminar de virosis en el cultivo de lechuga, se prospectaron 20 predios, con diferentes variedades de lechuga presentes en las zonas de Quillota y San Antonio, V Región, determinándose que:

En todos los predios con cultivos de lechuga prospectados, fue posible observar síntomas característicos de enfermedades virales como: mosaicos, encarrujamientos de hojas y enanismo. La incidencia de este tipo de enfermedades fue en promedio de 19,9% para la zona de Quillota y un 21,4% para la zona de San Antonio.

De acuerdo al análisis DAS-ELISA efectuados a las muestras obtenidas durante la prospección, sólo se detectó el virus del mosaico de la lechuga (LMV).

En relación a los demás virus testeados como CMV, TRV y TSWV, no se encontraron muestras positivas.

Respecto a la inoculación de plantas de lechugas y plantas indicadoras sanas que se realizó con extractos de muestras, testeados por ELISA, solamente se obtuvo un resultado positivo en una planta de *Chenopodium quinoa*, por lo que se debe revisar el procedimiento utilizado.

6. RESUMEN

La V Región es la segunda zona más importante de Chile en producción de lechugas, no existiendo a la fecha, ninguna referencia acerca de los virus que afectan a este cultivo.

En esta investigación se muestrearon un total de 20 predios, desde junio de 2003 a enero de 2004, en las provincias de Quillota y San Antonio, tomando muestras con síntomas virales aparentes, siendo posteriormente analizadas por medio de la prueba de DAS-ELISA e inoculación a plantas indicadoras y de lechugas libres de virus.

La prueba de DAS-ELISA reveló que sólo LMV estaba presente en las provincias de Quillota y San Antonio. No detectándose en ninguna de las muestras CMV, TRV o TSWV.

Se determinó, mediante incidencia viral que LMV está presente con un 19,8% en predios de la provincia de Quillota y con un 21,3% en predios de la provincia de San Antonio, presentando los síntomas característicos de esta enfermedad, es decir, mosaicos, encarrujamiento de hojas y un escaso desarrollo vegetativo de las plantas.

Los aislados de LMV fueron inoculados a plantas de lechugas e indicadoras, siendo traspasados, exitosamente a sólo una planta de *Chenopodium quinoa*, lo que fue confirmado por la prueba de ELISA. La inoculación a lechugas no fue exitosa. Por lo tanto se debe revisar el procedimiento utilizado.

7. ABSTRACT

The V Region is the second most important area of Chile in lettuces production. However, there are no references so far about the viruses that affects this crop.

20 lettuce fields were prospected, from June of 2003 to January of 2004, in the provinces of Quillota and San Antonio. Samples with apparent viral symptoms were taken, and later analyzed by DAS-ELISA test and inoculated to lettuce and indicator plants.

The DAS-ELISA test revealed that only LMV was present in all lettuce crop fields from Quillota and San Antonio. CMV, TRV or TSWV were not detected.

The viral incidence carried out in all fields showed that LMV was present in Quillota and San Antonio with an average of 19.8% and 21.3% respectively, showing the characteristic symptoms of this disease, mosaic, crinkle leaf and reduced vegetative development of plants.

The LMV isolates inoculated to lettuces and indicators plants were transferred, successfully, only to one single plant of *Chenopodium quinoa* which was confirmed by the DAS-ELISA test. The inoculation to lettuce plants was not successful, therefore the procedure must be reviewed.

8. LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. 1991. Fitopatología, México D.F., Limusa. 838p.
- APABLAZA, G. 2000. Patología de cultivos. Epidemiología y Control Holístico. Santiago. Ediciones Universidad Católica de Chile. 628p.
- BAKER, C. 2003. Lettuce Mosaic Virus, (on line), <http://plantpath.ifas.ufl.edu/pdc/inclusionpage/composites/lmvinfo.html>
- BLANCARD, D. 1990. Enfermedades del tomate. Madrid, ediciones Mundi – Prensa. 212p.
- BRUNT, A.A., CRABTREE, K; DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J. y WATSON, L. 2000. Viruses of plants: Descriptions and lists from the Vide Database. Oxon. UK. Cabi International. 1484p.
- BÜCHEN-OSMOND, C. 2003. ICTVdB Descriptions, (on line).
- CAMBRA, M., GORRIS, M.T. y TERRADA, M.E. 1996. Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus. In: G. Llacer, M.M. López, A. Trapero y A. Bello. eds. Patología Vegetal. Madrid, Sociedad Española de Fitopatología. pp. 207-254
- CLARK, M. y ADAMS, A. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. Journal of general virology 34: 475-483.
- CHATZIVASSILIOU, E., LIVIERATOS, I., JENSER, G. and KATIS, N. 2000. Ornamental plants and trips populations associated with tomato spotted wilt virus in Greece, (on line). www.phytoparasitica.org/phyto/pdfs/2000/issue3/chat2.pdf
- DAVIS, R., SUBBARO, K., RAID, R. and KURTZ, E. 2002. Plagas y enfermedades de la lechuga. Madrid. Ediciones Mundi – Prensa. 79p.
- EXPLORACION DE MERCADOS. 2003. Exploración de mercados, (on line). www.agrocadenas.gov.co/inteligencia/int_lechuga.htm.
- FLETCHER, J. 2003. Lettuce viruses, (on line). www.aphidwatch.com/lettuce/Lettuce-viruses.pdf

- FUCHS, M., PROVVIDENTI, R., SLIGHTOM, J.L. and GONZALVES, D. 1996. Evaluation of transgenic tomato plants expressing the coat protein gene of Cucumber Mosaic Virus strain WL under field conditions. *Plant Disease* 80(3):270–275.
- GERMAN, T.L. y HU, Y. 1990. Detection of tomato spotted wilt virus RNA in thrips using strand specific probes. *Phytopathology* 80:996-998.
- GIACONI, V. y ESCAFF, M. 1998. *Cultivo de hortalizas*. 13ª edición. Santiago, Ed. Universitaria. 337p.
- GOLDBERG, N. 2000. Tomato Spotted Wilt Virus, (on line). www.cahe.nmsu.edu/pubs/_h/h-242.html
- HILL, S. 1984. *Methods in Plant Virology*. London, Blackwell Scientific Publications. 167p.
- HORD, M.J., GARCIA, A., VILLALOBOS, H., RIVERA, y MACAYA, G. 2001. Field survey of Cucumber Mosaic Virus subgroups 1 and 2 in crop plants in Costa Rica. *Plant Disease* 85(9):925-954.
- JONES, R. 2003. Tomato Spotted Wilt and Impatiens Necrotic Spot Viruses spread by thrips, (on line). <http://agspsrv34.agric.wa.gov.au/agency/Pubns/farmnote/1993/F04193.htm>
- KUCHAREK, T., BROWN, L., JOHNSON, F. y FUNDERBURK, J. 2000. Tomato Spotted Wilt Virus of Agronomic, Vegetable, and Ornamental Crops. (on line). <http://plantpath.ifas.ufl.edu/takextpub/FactSheets/circ0914.pdf>
- LATORRE, B. 1995. *Enfermedades de las plantas cultivadas*. 4ª edición. Santiago, ediciones Universidad Católica de Chile. 628p.
- LOPEZ, L.A. 1994. Uso de la prueba del ácido viral de doble hebra (ARNdh) para detectar virus en semillas de frejol (*phaseolus vulgaris* L.) Tesis Ing. Agr. Concepción, Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. 64p.
- MARCHOUX, G. 1990. Cucumber Mosaic Virus on tomato crops: Strategies of research for the disease control. *Acta Horticulturae* 277:53 – 61.
- MAROTO, J. 1994. *Horticultura herbácea especial*. 4ª edición. Madrid, ediciones Mundi – Prensa. 611p.

- MAROTO, J., GOMEZ, A. y BAIXAULI, C. 2000. La lechuga y la escarola. Madrid, ediciones Mundi – Prensa. 242p.
- MESSIAEN, C.M., BLANCARD, D., ROUXEL, F. y LAFON, R. 1995. Enfermedades de las hortalizas. 3ª edición. Madrid, Mundi – Prensa. 576p.
- MORIONES, E. y LUIS, M. 1996. Métodos de control de las virosis. In: G. Llacer, M.M. López, A. Trapero y A. Bello. eds. Patología Vegetal. Madrid, Sociedad Española de Fitopatología. pp. 333-377.
- OCAMB, C. 2003. An online guide to plant disease control, Oregon State University, (on line). <http://plant-disease.ippc.orst.edu/disease.cfm?RecordID=681>
- ROBINSON, D. y HARRISON, B. 1989. Description of plant viruses, (online). www.dpvweb.net/dpv/showadpv.php?dpvno=346
- RYDER, E., GRUBE, R., SUBBARAO, K. and KOIKE, T. 2003. Breeding for resistance to diseases in lettuce: successes and challenges, (on line). www.leafyvegetables.nl/download/06_025-030_Ryder.pdf
- SMITH, I.M., DUNEZ, J., ELLIOTT, R.A., PHILLIPS, D.H. y ARCHER, S.A. 1992. Manual de las enfermedades de las plantas. Madrid, ediciones Mundi – Prensa. 671p.
- SPIEGEL, S., FRISON, E.A. and CONVERSE, R.H. 1993. Recent developments in therapy and virus – detection procedures for international movement of clonal plant germplasm. Plant Disease 77(12):1176-1180.
- TAPIA, B. y SALINAS, R. 2003. Descripción del mercado de las lechugas, (on line). www.odepa.gov.cl
- TOMLISON, J. 1982. ICTVdB Virus Descriptions, (on line). www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/57010038.htm
- VALENZUELA, M. 1995. Implementación de técnicas para la detección de virus y viroides en cítricos. Taller titulación Ing. Agr. Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 67p.
- ZITTER, T. 1984. Vegetables MD Online, (on line). vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Viruses_LeafyVege.htm

ANEXO 1: PLANILLA DE INCIDENCIA VIRAL

FECHA

NOMBRE DEL PREDIO

SUPERFICIE

VARIEDAD

TIPO DE RIEGO

FECHA TRANSPLANTE

DIRECCION

Mo: mosaicos

Hn: hojas necróticas

DI: dibujos lineales amarillos

Ci: clorosis intrevenal

Ot: otros

	SINTOMAS				
	Mo	Hn	DI	Ci	Ot
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					
48					
49					
50					

ANEXO 2: PROCEDIMIENTO PRUEBA DE ELISA

1. Recubrimiento

- ❖ Diluir el anticuerpo IgG 1000x en tampón recubrimiento (1:1000).
- ❖ Agregar 95 µl de la dilución a cada pocillo de la microplaca.
- ❖ Cubrir las placas herméticamente.
- ❖ Incubar en cámara húmeda a 30 °C por cuatro horas.
- ❖ Lavado. Vaciar los pocillos y lavarlos tres a cuatro veces con tampón lavado, removiendo cualquier líquido utilizando toalla de papel.

2. Antígeno

- ❖ Homogeneizar la muestra de la prueba en tampón extracción.
- ❖ Agregar 100 µl a cada pocillo de la microplaca.
- ❖ Cubrir las placas herméticamente.
- ❖ Incubar en cámara húmeda a 4 – 6 °C toda la noche.
- ❖ Lavado: se procede de igual forma que en la fase de recubrimiento.

3. Conjugado

- ❖ Diluir el conjugado enzima 1000x en tampón conjugado (1:1000).
- ❖ Agregar 95 µl a cada pocillo de la microplaca.
- ❖ Cubrir las placas herméticamente.
- ❖ Incubar en cámara húmeda a 30 °C por cinco horas.
- ❖ Lavado: se procede de igual forma que en la fase de recubrimiento.

4. Sustrato

- ❖ Disolver p – nitrofenil fosfato en 1 mg/ml en tampón sustrato.

- ❖ Agregar 95 μ l a cada pocillo de la microplaca.
- ❖ Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad.