



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Distribución del virus BSBMV (Beet soilberne mosaic virus) y del virus BNYVV (Beet necrotic yellow vein virus) en cuatro estados productores de remolacha azucarera en los Estados Unidos.

295165

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
MA. ESTHER DURAN GARCIA



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

Director de tesis: Dr. Charles M. Rush.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

RECEIVED
1974 JUN 14
10:34 AM

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Distribución del Virus BSBMV (Beet soilborne mosaic virus) y del
Virus BNYVV (Beet necrotic yellow vein virus) en cuatro estados
productores de Remolacha Azucarera, en los Estados Unidos.

realizado por María Esther Durán García.

con número de cuenta 8233794 - 6 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. Charles Monroe Rush	<i>Charles Monroe Rush</i>
Propietario	M. en I. B. B. Benito Estrada Mena	
Propietario	M. en C. Guadalupe Vidal Gaona	<i>Guadalupe Vidal Gaona</i>
Propietario	M. en C. Jaime Jiménez Ramírez	<i>Jaime Jiménez Ramírez</i>
Suplente	M. en C. Martha Martínez Gordillo	<i>Martha Martínez Gordillo</i>
Suplente		

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Patricia Ramos Morales



Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en la Estación Experimental Agrícola en el Estado de Texas, bajo la supervisión del Dr. Charles M. Rush dentro del proyecto, Estudio del virus BSBMV en la Remolacha Azucarera. Los datos del estudio fueron tomados en cuatro campos representantes de cuatro estados productores de remolacha en los Estados Unidos Americanos.

Índice

	Página
Título.....	1
Lugar de realización del trabajo.....	2
Índice	3
Abreviaciones	5
Resumen.....	6
Introducción.....	8
a. La producción de la Remolacha en los Estados Unidos.....	8
b. Furovirus	10
c. Polymyxa betae.....	12
d. Rizomanía.....	14
e. Control de la enfermedad.....	22
f. Detección y diagnóstico.....	24
g. El virus BNYVV	28
i Estructura Genómica y Biología Molecular del virus BNYVV	30
h. El virus BSBMV.....	32
i. Sintomatología.....	33
ii. Estructura geonómica y Biología Molecular del virus BSBMV	35
i. Justificación	37
j. Objetivos.....	38
Materiales y método.....	39

a. Sitios de muestreo	39
b. Toma de muestras	40
c. Esterilización	41
d. Siembra de las muestras de suelo	42
e. Toma de muestras de las raíces	44
f. Análisis de ELISA.....	45
g. Análisis de RT-PCR.....	48
h. Análisis estadísticos.....	51
Resultados.....	52
a. Campo de cultivo Bosch	52
b. Campo de cultivo Kammerzal	61
c. Campo de cultivo South Section.....	68
d. Campo de cultivo Scholl.....	76
Discusión.....	90
Conclusión	94
Perspectivas.....	98
Bibliografía.....	106

Abreviaciones.

BSBMV	Beet Soilborne Mosaic Virus
BNYVV	Beet Necrotic Yellow Vein Virus
°C	Grados Centígrados
NASS	Servicio Nacional de Estadística Agrícola
DAS-ELISA	Sándwich de Doble Anticuerpo de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
G	Gramos
GPS	Sistema de Posición Global
Hrs.	Horas
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía en Virus
Kb	Kilo bites
kDa	Kilo Daltones
m	Metros
min	Minutos
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
ORF	Marco de lectura abierta
PVC	Cloruro de polivinilo
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polimerasa Chain Reaction
TGB	Bloque de Triple Genes
T/ha	Tonelada/hectárea
µg/ml	microgramos/mililitro
µl	microlitros

Resumen

Los cuatro campos de cultivo que representan a dos áreas importantes para la producción de remolacha, incluyen a los estados de Minesota y Dakota de Norte, los cuales representan la mayor área de producción de remolacha, en el Alto Medio Oeste de los Estados Unidos y los estados de Colorado y Texas que pertenecen a la Región de las Grandes Planicies, la cual es la región geográfica más extensa del país. En estos campos, durante los meses de agosto y septiembre de 1999 y el mes de agosto del 2000, se realizaron dos muestreos de suelo, uno general y otro intensivo, con el fin de determinar la presencia y distribución de los virus BSBMV (Beet Soilborne Mosaic Virus) y BNYVV (Beet Necrotic Yellow Vein Virus). En un total de 584 muestras de suelo obtenidas para ambos muestreos fueron plantadas semillas de remolacha y puestas a cultivar en el invernadero de la Estación Experimental Agrícola del Estado de Texas, después fueron cosechadas las raíces de estas remolachas y analizadas por medio de la técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para detectar la presencia de los antígenos de los virus BSBMV y BNYVV. Para el muestreo general del cultivo del estado de Minesota se obtuvieron un total de 80 muestras de las cuales, seis fueron positivas para los antígenos del virus BSBMV, 37 fueron positivas para los antígenos del BNYVV, 23 presentaron ambos antígenos en la misma muestra; para el muestreo

intensivo se registraron 156 muestras de las cuales 10 fueron positivos para los antígenos del virus BSBMV, 42 fueron positivos para los antígenos del virus BNYVV y ocho presentaron ambos antígenos en la misma muestra. Para el muestreo general del campo de cultivo del estado de Colorado se obtuvieron un total de 70 muestras de las cuales 36 fueron positivas para los antígenos del virus BSBMV, seis fueron positivas para los antígenos del BNYVV, 13 presentaron ambos antígenos en la misma muestra; para el muestreo intensivo de 59 muestras, 15 se registraron positivas para los antígenos del virus BSBMV, 10 fueron positivas para los antígenos del BNYVV y cinco presentaron ambos antígenos en la misma muestra. Para el muestreo general del campo de cultivo del estado de Texas donde se obtuvieron 45 muestras, 27 se encontraron positivas para los antígenos del virus BSBMV, no se encontró ninguna muestra positiva para los antígenos del BNYVV y tres presentaron ambos antígenos en la misma muestra; para el muestreo intensivo de 100 muestras obtenidas, 47 fueron positivas para los antígenos del virus BSBMV, no se encontró ninguna muestra positiva para los antígenos del BNYVV y sólo una presentó a ambos antígenos en la misma muestra. Para el único muestreo realizado en el campo de Dakota del Norte, muestreo general, se obtuvo un total de 74 muestras de las cuales, no se encontró ninguna muestra positiva para los antígenos del BSBMV, 37 fueron positivas para los antígenos del BNYVV y sólo una presentó a ambos antígenos en la misma muestra.

Introducción

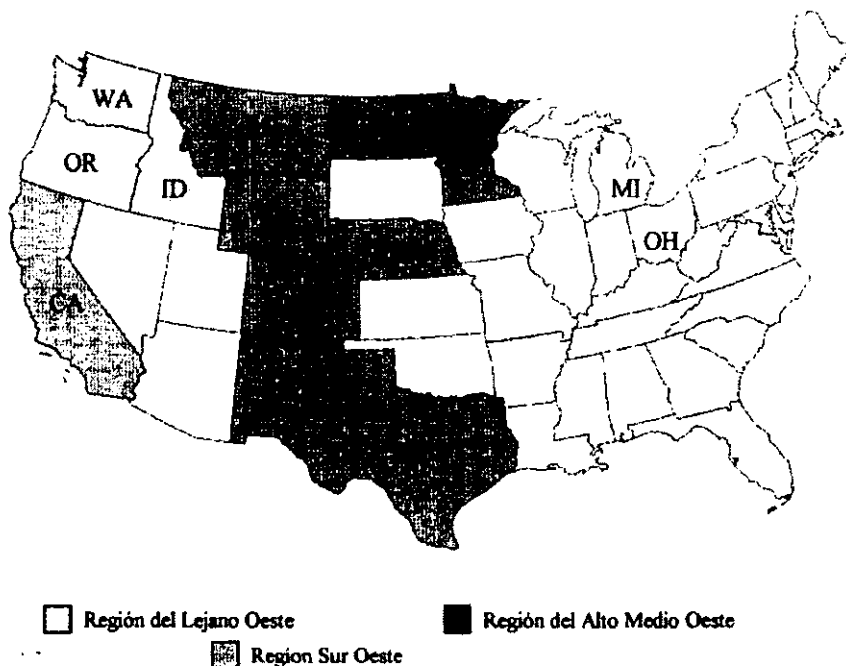
Producción de remolacha

La producción de remolacha (*Beta vulgaris L.*) representa cerca del 50 % de la producción total de azúcar en los Estados Unidos. Durante el año 2000, el Servicio Nacional de Estadística Agrícola (NASS), estimó una producción anual de 33.319 millones de toneladas de remolacha, cultivadas en una extensión de 1 527 000 de acres y una cosecha aproximada de 21.8 toneladas por acre (Sugar and Sweetenwrs Yearbook, 2000)

En los Estados Unidos, la remolacha se produce en cinco regiones geográficas: La región de los Grandes Lagos, que incluye Michigan y Ohio, produce el 8.53% de la producción anual. La región del Alto Medio Oeste que comprende los estados de North Dakota y Minnesota, constituyen la mayor área de producción nacional de la remolacha con el 46.22%. La región de las Grandes Planicies, que es la región geográfica más extensa, porque incluye los estados de Montana, Wyoming, Nebraska, Colorado, y Nuevo México, produce aproximadamente el 14.48% de toda la producción anual de remolacha. La región del Lejano Oeste formada por los estados de Idaho, Oregon y Washington, producen aproximadamente el 21.87% del total anual de producción. Esta región es especialmente importante para la industria de remolacha de los Estados Unidos ya que el estado de Oregon es el mayor productor de semillas de remolacha de todo el país. Dentro de esta región se encontraba el estado de Texas como un productor

importante; pero debido a diferentes enfermedades que afectaron a la remolacha en la misma, la industria azucarera cesó su producción. La región Suroeste sólo incluye el estado de California; el cual produce el 8.87 % de la producción total nacional, además es la región que tiene mayor diversidad agronómica y climática de las zonas productoras, lo cual hace posible una producción de remolacha durante todo el año. Sin embargo esta región a declinado notablemente su producción debido a diversos factores (Sugar and Sweeteners Yearbook, production by commodities 2000) [Figura #1] Uno de los principales factores causantes de la disminución en la producción es la rizomanía, una devastadora enfermedad causada por el virus BNYVV (Beet Necrotic Yellow Vein Virus) virus de la vena amarilla necrótica de la remolacha, y el virus BSBMV (Beet Soilborn Mosaic Virus) virus del mosaico de la remolacha contenido en el suelo, virus que anteriormente pertenecieron al grupo de los *Furovirus* y que ahora se han clasificado dentro del género *Benyvirus*.

Fig. #1 Mapa de distribución de regiones productoras de remolacha en la Unión Americana



Los *Furovirus*

Los *Furovirus*, son un grupo de virus que se transmiten por medio de hongos del género *Plasmodiophoromyces* y que se caracterizan por su forma cilíndrica (rod-shaped), con una cadena sencilla de RNA y con un genoma típicamente bipartido (Brunt y Richards, 1989). El nombre fue propuesto inicialmente por Shirako y Brakke en 1984 y fue aceptado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) en 1987. Los

Furovirus se han encontrado en las regiones templadas de los cinco continentes; sin embargo existen algunos que tienen una área geográfica restringida; la mayoría de ellos infectan cereales, leguminosas, raíces y tubérculos (Richards y Tamada, 1992). Como ejemplo de estos virus tenemos a los virus que infectan cereales como el virus SBWMV (Soil-Borne Wheat Mosaic Virus); virus que infectan raíces y tubérculos como los virus BNYVV (Beet Necrotic Yellow Vein Virus), BSBV (Beet Soilborne Virus) [Brunt y Richards, 1989] y el virus BSBMV (Beet Soilborn Mosaic Virus) [Rush, French y Heidel, 1993], virus que infectan leguminosas como el virus BBNV (Broad Bean Necrosis Virus) y el virus PCV (Peanut Clump Virus) y virus que infectan malezas como el virus HMV (Hypochoeris Mosaic Virus), el virus NVMV (Nicotina Velutina Mosaic Virus) [Brunt, Richards, Richards K., y Tamada, 1992] y recientemente el virus SCSV (Sorghum Chlorotic Spot Virus) [Kendall, Langenber y Lommel, 1988]. Se ha encontrado que los virus HMV (Hypochoeris Mosaic Virus) y NVMV (Nicotina Velutina Mosaic Virus) infectan únicamente a malezas.

Basado en la organización y las secuencias de sus genomas, estos virus se han reclasificado en los siguiente géneros: *Furovirus* (como el virus SWMV), *Pecluvirus* (como el virus QPCV), *Pomovirus* (como el virus PMTP) y *Benyvirus* (como los virus BNYVV y BSBMV). A estos géneros no se les ha asignado ninguna familia o familias aún. (Tamada, 1999) Los *Benyvirus* difieren de los virus *Tobamovirus*, *Tobravirus* y *Hordeivirus* en el mecanismo de síntesis de sus polimerasas, en la organización de su genoma y en sus diferentes estrategias de infección (Tamada, 1999; Torrance y Mayo, 1997) Por ejemplo, el virus BNYVV tiene poliadenilada su secuencia de bases 3'

terminal, cosa que no se observa en otros virus. La proteína polimerasa asociada a la replicación del RNA del BNYVV se deriva de una proteína precursora que se autoprocresa. En comparación, otros virus presentan otros mecanismos para la producción de sus polimerasas. Debido al tipo de síntesis de su polimerasa, el BNYVV es incluido en el mismo grupo del virus animal *Togavirus* en la superfamilia de los *Alphavirus*. Los otros miembros de los *Benyvirus* como el virus BSBMV y el virus BdMV (Burdock Mottle Virus), cuentan con una organización geonómica similar y secuencias homólogas al virus BNYVV, aunque el virus BSBMV esta más relacionado con el virus BNYVV que con el virus BdMV.

Los *Furovirus*, *Benyvirus* y *Pomovirus* pueden ser transmitidos por los hongos *Polymyxa graminis*, *Polymyxa betae* o *Spongospora subterranea*. Estos tres hongos pertenecen a la familia de los *Plasmodiophoromycetes*, parásitos obligados de raíces y tubérculos; aunque el ciclo de vida de *P. betae* y *P. graminis* es similar, ambos hongos se consideran como diferentes, debido a las distintas especies de hospederos que infectan. A *Polymyxa betae* se le reconoce como el vector del virus BNYVV y del virus BSBMV (Tamada, 1975; Fujisawa y Sigimoto, 1977; Brunt, 1989; Heidel y Rush, 1995) Los cuales causan la rizomanía, una enfermedad devastadora de la remolacha.

Polymyxa betae

El hongo *Polymyxa betae*, es un parásito obligado con un rango muy limitado de hospederos que comprenden a plantas de las familias Chenopodeaceae, Amarantaceae y Portulaccaceaceae (Abe y Tamada, 1986). La relación entre los virus BNYVV y

BSBMV y su vector *P. betae* es representativa del ciclo de infección de la mayoría de los *Furovirus* (Brunt, 1989) El hongo *P. betae* sobrevive en los suelos de cultivo en estadio de cystosora. (Figura 2); en la presencia de un hospedero y en condiciones ambientales favorables; las cystosoras liberan zoosporas que nadan libremente

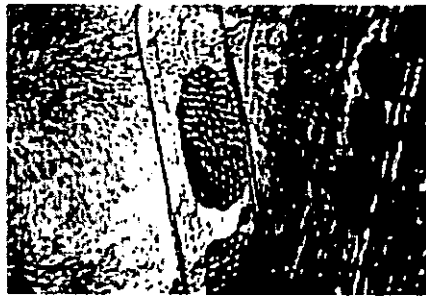


Fig. 2. Cystisora de *polymyxa betae* en células de la raíz de la remolacha

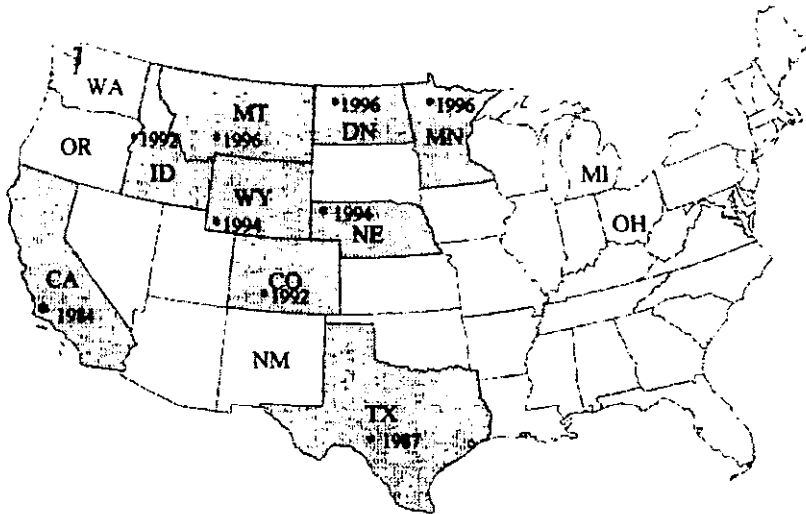
a través del agua presente en el suelo, hasta que se ponen en contacto con las raíces de su hospedero, enquistándose. Las zoosporas enquistadas producen una estructura llamada "stachel", a través del cual el citoplasma zoospórico penetra a las células del hospedero y se convierte en un plasmodio que si contiene virus, los libera en las raíces del hospedero. Después de cierto periodo, el plasmodio se desarrolla en un zoosporangio que libera zoosporas adicionales que repiten el ciclo de infección (Barr, 1988). Cuando *P. betae* no es virulenta e infecta a las células de raíces de remolachas que contienen el virus; el virus se puede incorporar al plasmodio y así transmitirlo a nuevas plantas. Se cree que el virus no se replica dentro de *P. betae*, pero el mecanismo por el cual *P. betae* transmite las partículas del virus aún no se conoce. Algunos plasmodios no se desarrollan sino que forman quistes que quedan contenidos en las células de las raíces y cuando las raíces

fenecen, los quistes que contienen el virus son liberados en el suelo donde pueden permanecer viables por años sin perder su virulencia (Rush y Heidel, 1995).

Rizomanía

La Rizomanía o raíces locas, causada por el virus BNYVV, es una de las enfermedades más devastadoras que atacan a la remolacha. Fue identificada por primera vez en Italia en 1949 y desde entonces se ha encontrado en Estados Unidos, Gran Bretaña, Japón y en la mayoría de los países europeos productores del vegetal (Kaufmann y Koeing, 1992). La rizomanía fue reportada por primera vez en los Estados Unidos en el estado de California en 1984 y en Texas en 1987 (Duffus, 1984). En ese entonces se pensó que la enfermedad estaba limitada a esos dos estados, pero de 1992 a 1994 fue encontrada en los estados de Colorado, Idaho, Nebraska y Wyoming (Figura #3)(Rush, 1995)

Fig#3 Mapa de avance de la rizomanía en los principales estados productores de remolacha



Estados donde se ha registrado la Rizomanía en los Estados Unidos

Los síntomas foliares de esta enfermedad incluye clorosis y en las hojas que están severamente infectadas, la enfermedad se manifiesta con hojas marchitas durante el día, aunque la temperatura del suelo sea la adecuada, y recuperan turgencia durante la noche. Las plantas infectadas con el virus BNYVV también suelen presentar crecimiento excesivo de la base de la corona, y las hojas pueden crecer en posiciones fuera de lo normal (Figura #4). El síntoma de la vena necrótica, por el cual el virus fue nombrado es extremadamente raro de observar a simple vista en las etapas tempranas de infección. Por otro lado los síntomas foliares son fácilmente confundidos con la deficiencia de nitrógeno.



Fig. 4 Síntomas foliares de una remolacha que presenta rizomania

Los síntomas en las raíces asociados a la rizomania son variables dependiendo de cuando éstas hayan sido infectadas. El diagnóstico más común de la infección se presenta cuando las plantas han sido infectadas en estadios juveniles presentando una gran proliferación de raíces laterales con decremento en el peso, rigidez y ligera coloración amarillacea, dando una apariencia de barba (Figura #5) [Brunt y Richards, 1989; Tamada, 1975]. Al analizar las raíces laterales en el microscopio se pueden observar las cystisoras de *P. betae*.



Fig.#5. Raíz de una remolacha que presenta los síntomas de la rizomania.

Cuando el suelo es muy frío o seco, las plántulas, no presentan infección, pero la infección del virus puede entonces ocurrir en estadios avanzados de crecimiento; cuando las condiciones ambientales son favorables. La infección en estos casos es menos dañina, ya que las raíces son constreñidas solamente en el punto de infección dando apariencia de una copa de vino (Figura #6), las raíces barbadas no se presentan o sólo se presentan en una pequeña porción de la parte constreñida de la raíz.



Fig. 6 Constricción de las raíces de remolacha causada por el virus BNYVV

En California desde 1983, la rizomanía ha sido uno de los principales factores responsables de la reducción de un 33% en la producción de remolacha. En el Paso Robles, una área de Salinas Valley en California, fue donde se reportó por primera vez la existencia del virus BNYVV en los Estados Unidos. Actualmente esta área ha parado completamente la producción de remolacha y un gran número de áreas en la parte norte del estado han experimentado grandes pérdidas (Rush y Heiden, 1995). La rizomanía no solamente se presenta de una manera devastadora en los cultivos, acabando completamente con la producción, sino que se puede presentar de una manera menos drástica, afectando el tamaño del camote y el contenido de azúcar, como se mostró en una serie de estudios llevados a cabo en los estado de Colorado, Wyoming y Texas (Rush y Heiden, 1995). En el estado de Colorado, en 1993 se detectó al virus BNYVV en los cultivos de remolacha, en ese año, el porcentaje de cosecha para estos cultivos fue de 44.9 t/ha con un 17.08 % de contenido de azúcar mientras que anteriormente el porcentaje oscilaba entre 51.1 t/ha con 17.08 % de contenido de azúcar. Para los cultivos de 1994, en el mismo estado, el porcentaje de cosecha de nueve cultivos identificados positivos para el virus BNYVV fue de 45.9 t/ha con un contenido de azúcar de 15.15 %, con un promedio anteriormente de 49.1 t/ha con un contenido del 15.64 %. Los resultados para Texas y Wyoming en el año de 1994 fueron similares. En Texas de 176 campos examinados para el virus BNYVV, 52 fueron positivos y el porcentaje de

producción obtenido para estos cultivos fue de 42.9 t/ha con un contenido de azúcar del 14.9 %; mientras que en los cultivos negativos para el virus BNYVV fueron de 42.4 t/ha con un contenido de azúcar del 15.09 %. En la actualidad el estado de Texas ha parado completamente la producción de la industria azucarera debido a que los cultivos de remolacha en esta área han sido afectados por diversas enfermedades, entre ellas las producidas por los virus BNYV y BSBMV. En Wyoming 300 muestras fueron sometidas a prueba, de las cuales 158 fueron negativas y 112 fueron positivas para el virus BNYVV sin haber una diferencia significativa en la producción. El porcentaje de concentración de azúcar puede variar dependiendo del estadio de infección del patógeno, si la planta se infecta durante estados tempranos del crecimiento, la reducción del contenido de azúcar se afecta considerablemente, en cambio si la infección ocurre en estados mas avanzados sólo se afecta el tamaño del camote pero no la concentración de azúcar. (Rush y Heiden, 1995).

En algunas ocasiones se han encontrado cultivos de remolacha infectados con el virus BNYVV sin efectos sobre la producción. Hasta ahora no se ha encontrado una explicación para estos resultados sorprendentes. Una razón pudiera ser que los estados de Colorado, Texas y Wyoming practican una siembra temprana de la remolacha antes de la temporada, la cual no favorece el desarrollo de *P. betae* ya que las temperaturas existentes en esa época varían desde los 5 y los 15°C, muy por debajo del óptimo requerido para la infección del virus; es de esta manera que los productores de estos estados normalmente evitan la infección de plántulas a menos que se vean forzados a plantar o replantar cuando las temperaturas del suelo son mas altas (Harveson y Rush,

1993). Otra posible razón por la que la producción no se reduce en cultivos infectados con el virus BNYVV, podría estar relacionada con la carga viral del vector *P. betae* presente en esos cultivos. Gerik y Duffus (1989), encontraron en California que una cepa virulenta de *P. betae* algunas veces se encuentra limitada a pequeñas áreas dentro del terreno y concluyen que en dicho terreno la población virulenta se introdujo recientemente. Ellos también sugieren que poblaciones virulentas de *P. betae*, podrían reemplazar a poblaciones no virulentas, por lo tanto, como el virus BNYVV se ha introducido recientemente en Colorado, Texas y Wyoming, las pérdidas mínimas en la producción que se han encontrado en campos infectados podrían ser atribuidas a la baja densidad de inoculante del virus o a la limitada distribución virulenta de *P. betae* y es por esta misma razón que se teme que esta enfermedad podría aumentar las pérdidas en la producción de la remolacha en el futuro conforme las cepas de *P. betae* virulentas sigan incrementando su distribución en los campos de estos estados (Gerik y Duffus, 1989).

Control de la Enfermedad

El control de la enfermedad por medio de prácticas de agricultura tradicional, como plantar lo mas temprano posible cuando las temperaturas del suelo son aun bajas para permitir la infección del hongo *P. betae*, han sido bastante efectivas en detener la aparición de la enfermedad, ya que solamente estadíos juveniles de las plantas de remolacha o tejidos de raíces primarias son más susceptibles a la infección de *P. betae*; el plantar en épocas tempranas permite el establecimiento de raíces primarias antes de que ocurra la infección, sin embargo la infección durante etapas tardías del crecimiento reducen el contenido de azúcar del producto, aunque aun así se puede obtener una producción aceptable (Gerik y Duffus, 1978). Otro método de control es plantar campos con remolachas transplantadas que han pasado la etapa de plántulas (Gerik y Temple, 1991) [Este método ha sido utilizado en Japón, pero no en EUA debido a su alto costo] Otras prácticas agrícolas que se han sugerido para reducir la incidencia y severidad de la rizomanía o para limitar la dispersión del patógeno incluyen: limitar la duración del riego e incrementar la frecuencia, evitar la introducción de suelo infectado a campos limpios del patógeno y prolongar de rotación de cultivo. A pesar de la aplicación de buenas prácticas de cultivo, las pérdidas por rizomanía siguen siendo excesivas, en tales casos se recomiendan medidas de control adicional como métodos químicos, especialmente fumigantes del suelo, los cuales han sido parcialmente efectivos reduciendo las pérdidas de producción de remolacha, pero estos medios son económicamente muy costosos y

poco rentables para los agricultores (Martín y Whitney, 1990). La búsqueda de especies tolerantes o resistentes es llevada activamente desde 1978, sin embargo aunque ya existen algunas especies tolerantes, esta tolerancia no ha sido suficiente para producir cultivos económicamente rentables, especialmente en campos donde la densidad del *P. betae* virulenta es alta o donde otros patógenos están presentes (Harveson y Rush, 1993 y 1994). Otro mecanismo de control podría ser el predecir o estimar el nivel de infección en los campos que está directamente relacionado con las pérdidas en la producción. Este tipo de datos podría ser de mucha ayuda para la adaptación de variedades resistentes y otras medidas de control antes que estos campos sean plantados y con esto poder manejar estrategias de protección en campos infectados (Tamada, 1999).

DetECCIÓN Y DIAGNÓSTICO

Diferentes hongos patógenos del suelo, bajo condiciones favorables para su infección pueden causar síntomas que fácilmente pueden confundirse con la rizomanía. Es por ese motivo que la excesiva proliferación de sus raíces laterales no es un buen síntoma de diagnóstico para predecir la presencia de los virus BNYVV o BSBMV en remolachas infectadas. Análisis de sándwich de doble anticuerpo DAS de la técnica denominada ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) y análisis de la técnica de RT-PCR (Reverse Transcriptase-polimerase Chain Reaction) son dos formas que se utilizan para la detección de BNYVV, BSBMV y otros *Furovirus* patógenos de los cultivos de remolachas. Uno de los métodos más utilizados para la detección de los virus contenidos en el suelo es la técnica denominada ELISA. La sensibilidad de detección de la reacción antígeno-anticuerpo puede incrementarse por la adición de un marcador a cualquiera de los dos reactantes y que este pueda ser detectado en cantidades mínimas (Feteanu, 1978), estos marcadores pueden ser enzimas, colorantes fluorescentes, o materiales radioactivos. El uso de enzimas para marcar anticuerpos fue reportado por primera vez en 1966 y fue originalmente desarrollado para la localización de antígenos en preparaciones histológicas para microscopios óptico y electrónico (Nakane y Pierce, 1966) además de identificar líneas de precipitación en exámenes de inmunodifusión (Avrameas y Uriel, 1966). Sin embargo, se ha encontrado que cuando los reactivos son adheridos a una fase sólida, los inmuno-análisis enzimáticos son particularmente útiles

para medir cuantitativamente a los antígenos y anticuerpos. A partir de esto, se desarrolló el método llamado ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) el cual fue adoptado rápidamente por muchos laboratorios para el diagnóstico de enfermedades transmitidas a través de virus y para la cuantificación de concentraciones muy pequeñas de virus y anticuerpos específicos (Van Regenmortel, 1982). Para la fase sólida, la mayoría de los investigadores usan placas de poliestireno o de cloruro de polivinilo que son comúnmente usados en análisis de hemoaglutinación. Variaciones de la técnica ELISA se han desarrollado, dependiendo del reactivo que se utiliza para adherir a la fase sólida, una de estas variaciones es conocida como ELISA método indirecto, el cual es usado para medir las concentraciones de anticuerpos virales y consta de los siguientes pasos: (1) colocar una capa de la preparación del virus en los orificios de las placas (fase sólida); (2) ligar el virus específico al anticuerpo presente en el suero de análisis; (3) ligar la enzima conjugada antiglobulina; (4) adición del sustrato por revelación calorimétrica de la enzima conjugada ligada al anticuerpo. La presencia de la enzima ligada a los pozos de las placas usados como fase sólida es revelada por un sustrato cromogénico, que inicialmente es incoloro pero después se torna amarillo como producto de la degradación enzimática. Además de poder reconocer a simple vista el color de la reacción enzimática, que es muy adecuado para analizar muestras infectadas de virus en el campo. Para lecturas más precisas se utiliza el espectrofotómetro (King y Kochoumian, 1979). Para la detección de virus que atacan a las plantas se utiliza otra variación de ELISA llamado sándwich de doble anticuerpo DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977). En este método a diferencia del anterior se aplica una capa de un anticuerpo viral globular y después una

capa de la preparación del virus que será atrapado por el anticuerpo ya fijado a la fase sólida. La presencia del virus se revela por un conjugado de enzima-anticuerpo. A diferencia del procedimiento de ELISA método indirecto el DAS-ELISA necesita de la preparación de diferentes anticuerpos conjugados para cada virus analizado; sin embargo, este método tiene la ventaja de asegurar la adición estandarizada de los diferentes virus al anticuerpo inicialmente añadido a la fase sólida. Esto elimina cualquier diferencia en afinidad a la fase sólida que cualquier virus pudiera presentar (Figura #7) DAS- ELISA es el mejor y más rápido método para el diagnóstico de gran número de muestra y aunque el método del RT-PCR es más sensible y específico que el DAS-ELISA la técnica no ha sido apropiada para procesar muchas muestras a la vez y su costo es mucho mayor. No obstante el gran tiempo que se requiere; uno de las metodologías más precisas para detectar el virus BNYVV en los campos de cultivo es el siguiente: se toman muestras de suelo posiblemente infectadas con *P. betae* y se siembran semillas de remolacha directamente en este suelo o se transplantan plántulas con dos o tres semanas de crecimiento.

Estas plantas deben ser bien regadas y mantenidas a temperaturas entre los 20 y 25°C de 12 a 16 semanas (Figura 8), después se cosechan las raíces y se analizan por medio de la técnica de DAS-ELISA. Si las plantas no son cosechadas durante las 14 y 17 semanas, pueden presentar un excesivo crecimiento de las raíces con un índice necrótico muy alto y dar lugar a resultados erróneos en los análisis. (Kaufmann, Koenig, y Rohloff, 1993).

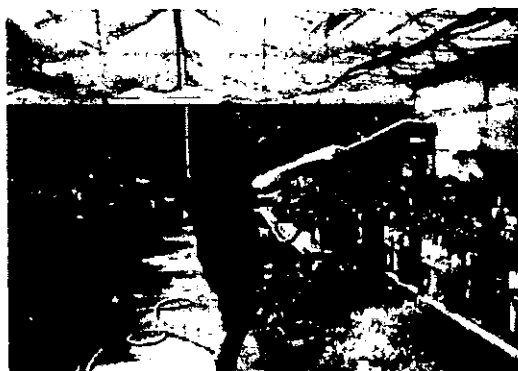


Fig.# 8 Mantenimiento de plantas inoculadas con suelo infectado con BSBMV y BNYVV en el invernadero.

El virus BNYVV (Beet Necrotic Yellow Vein Virus)

Como se ha mencionado, el virus BNYVV causa daños severos en la producción de la remolacha. Estas pérdidas varían dependiendo, de la cantidad del virus presente en el suelo, las condiciones ambientales presentes al momento de la infección y el estadio de crecimiento en el que el patógeno infecta a la planta. Una enfermedad severa conlleva a una reducción importante hasta de un 50% en la producción del cultivo, además se puede presentar una reducción en el contenido de azúcar de un 16-18%. Como el BNYVV sobrevive en el suelo por muchos años sin ningún decremento en su infectividad, ha ocasionado que los agricultores eviten cultivar en los campos altamente infectados. El virus ha presentado una gran capacidad de dispersión a nivel mundial (Tabla #1). Por ejemplo, desde los inicios de la infección en 1949 cuyo origen se desconoce, las grandes áreas de cultivo de remolacha en Europa, China y E.U. estaban libres de este virus, hasta que hace 15-20 años una gran dispersión del virus se ha dado en varios países productores de remolacha del mundo (Tabla 1).

Tabla 1. Brotes de Rizomania (BNYVV) en el mundo.

Año	País (regiones principales)
1949	Italia (regiones del norte)
1950	Japón (Hokkaido)
1951	Yugoslavia (Serem)
1952	Grecia (Thessaly y Yannouli area)
1953	Francia (Región Erdtein, Alsace)
1954	Alemania (Partes del suroeste de Hesse cerca de Frankfurt)
1955	Checoslovaquia, China (Mongolia)
1956	Australia (Valle del Danubio), Rumania, USSR
1957	Hungría
1958	E.U.(California), Suiza, Bulgaria, y Noruega.
1959	Bélgica
1960	Reino Unido (Al este de Anglia), Turquía.
1993	España

Datos tomados de Tamada, 1999.

Estructura Genómica y Biología Molecular del virus BNYVV

Las partículas del virus BNYVV se caracterizan por ser de forma cilíndrica de un diámetro aproximado de 20 nm. El genoma del virus BNYVV consiste en cinco cadenas simples de RNA designados RNA1 al RNA5 en orden decreciente de tamaño. Los cinco RNA están formados por 14599 nucleótidos excluyendo la cadena terminal de adenina.

El RNA1 mide 390 nm., el RNA 2, 270 nm., el RNA 3, 105 nm., el RNA4 , 90 nm. y el RNA5 de 80 nm. Estas cadenas de RNA constituyen el 5% del peso total del virus y están envueltas en 49 subunidades de una proteína de 21kDa. (Tamada, 1992; Rush y Heiden, 1995; Richard y Tamada, 1999).

El RNA1 codifica para un polipéptido de 237 kDa. involucrada en la replicación del genoma viral. (RNA Polimerasa)

El RNA2 tiene seis marcos de lectura abierta (ORF) El primer ORF cercano al extremo 5' terminal, codifica para la proteína de la cápside de un peso 21kDa. El segundo ORF esta localizado inmediatamente al primer ORF y codifica para una proteína de 75kDa que está relacionada con el ensamblaje del virus y la transmisión al hongo. La parte central del RNA2 contiene un grupo de tres genes conocida como "Bloque triple de genes" (TGB) que codifican para 1) una proteína de 42Kda. que se cree esta asociada al movimiento del virus de célula a célula (Tamada, 1999; Richard y Tamada, 1992); 2) una proteína de 13kDa. que está relacionada con la expansión de la membrana celular; 3) una proteína de 15kDa. que posee una cadena terminal hidrofóbica. El último ORF

localizado cerca de la secuencia 3' terminal codifica para una proteína rica en cisteína, que parece regular la expresión del genoma del hospedero.

El RNA3 codifica a una proteína de 25kDa. de la cual aun no se sabe su función, pero se conoce que está presente en el citoplasma y núcleo de hojas infectadas. El RNA3 está relacionado con la expresión de los síntomas de la enfermedad. El RNA4 está relacionado con la transmisión del virus al hongo y también codifica para una proteína de 31kDa que no se sabe su función. El RNA5 que codifica para una proteína de 26kDa. la cual esta relacionada con la expresión de los síntomas de la enfermedad (Figura 9) Los RNAs 3,4,5 cuentan con tres secuencias no codificadoras de 445, 379, y 443 nucleótidos de longitud en la región 5' terminal (Tamada, 1999; Rush y Heiden, 1995; Richard, y Tamada, 1992; Tamada, 1975).

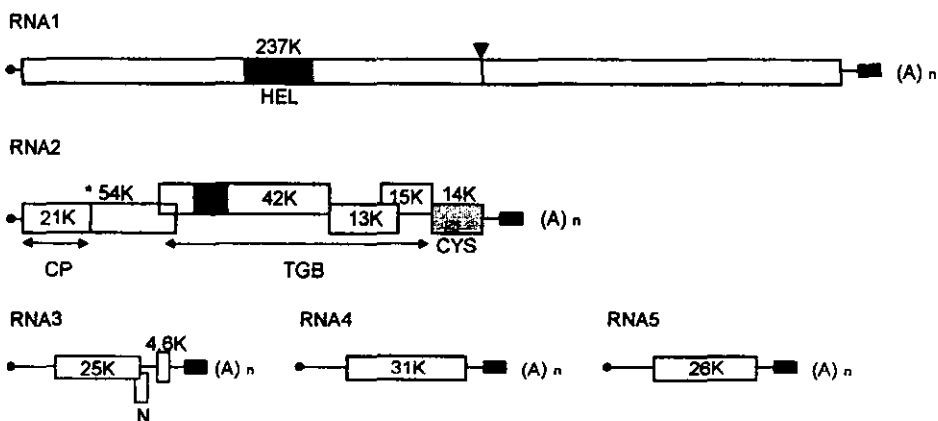


Fig. #9 Organización geonómica del virus BNYYV. Cada cuadro representa los marcos de lectura abierta ORFs, los pequeños rectángulos en negro representan las cadenas de 3' poli A; la K representa los tamaños de los productos polipeptídicos en unidades de kDa; CP es la proteína de la cápside; TGB Bloque de triples genes; Cys Proteína rica en cisteína.

El virus BSBMV (Beet Soilborne Mosaic Virus)

El virus BSBMB (Beet Soil-borne Mosaic Virus) fue identificado en Texas en 1988. Este virus fue reportado morfológicamente similar al virus BNYVV además de ser transmitido por el mismo vector *P. betae* (Liu y Duffus, 1988). En un principio se encontraron dos cepas de este virus a las que se les designó TX7 y TX8 Wisler et al. (Wisler, Duffus, y Liu, 1993), sin embargo por medio de pruebas con anti-suero policlonal de los virones purificados, se determinó que las nuevas cepas eran serológicamente iguales entre sí, pero distintas del virus BNYVV (Wisler, Liu y Duffus, 1994). El nombre del virus BSBMV “Beet Soilborne Mosaic Virus” fue usado por primera vez en 1993 para describir a la cepa viral con el serotipo TX7 (Wisler, Duffus y Liu, 1993).

Durante 1991 y 1992, un monitoreo de la enfermedad fue realizada en el estado de Texas revelando que el virus BSBMV estaba distribuido a lo largo de todas las áreas productoras de remolacha (Heidel y Rush, 1994). Desde 1992, el virus BSBMV se ha identificado en los estados de California, Colorado, y Wyoming (Rush y Heidel, 1995).

Síntomas del virus BSBMV

Los síntomas causados por el virus BSBMV pueden ser extremadamente variables. Las plantas presentan síntomas foliares sistémicos fáciles de distinguir en los cultivos durante los meses de septiembre y octubre. Estos síntomas son más aparentes que los causados por el virus BNYVV, pero la incidencia de infección del virus BSBMV es más baja comparada con la del virus BNYVV. Los síntomas foliares más comunes que produce el virus BSBMV incluyen: manchas amarillas o verde claro; además, se observan patrones moteados o de mosaico o bandas de color amarillo brillante en las venas primarias de las hojas, síntomas similares a los producidos por el virus BNYVV, pero en este caso las bandas son más anchas que las causadas por el virus BNYVV (Figura #10) Se cree que estos síntomas pueden estar relacionados con el medio ambiente, la especie de cultivo de remolacha cultivada o la variación genética de las diferentes cepas virales. Una sintomatología similar se ha observado en *Cheonopodium quinoa* (Koenig y Burgermeister, 1989).



Fig. #10 Vista cercana de los síntomas foliares típicos causados por el virus BSBMV

Es imposible identificar cultivos de remolacha infectados por el virus BSBMV a simple vista a menos que se hayan desarrollado los síntomas foliares. Cuando el virus fue identificado en 1983, se colectaban remolachas con síntomas foliares de BSBMV, con sus raíces sin anomalías de ningún tipo, sin embargo durante la temporada de cosecha entre 1993 y 1994, se encontraron algunas remolachas con los síntomas clásicos de la rizomanía (constreñidas en la parte baja de la raíz y de apariencia barbada) y que resultaron ser negativas para el virus BNYVV y positivas para el virus BSBMV por medio de la técnica DAS-ELISA (Rush y Heidel, 1996). Fue entonces cuando surgió la idea de que algunas cepas de BSBMV podían ser más virulentas.

Basándose en los estudios anteriormente mencionados, se considera que el virus BSBMV puede llegar a ser un gran problema para la industria azucarera, sobre todo si se considera su amplia distribución en los estados productores de remolacha en el oeste del país. Por otro lado, se ha encontrado, que cuando los virus BSBMV y BNYVV son co-inoculados en *C. quinoa* o *Beta marítima*, el virus BSBMV interfiere con la expresión de los síntomas del virus BNYVV y los síntomas fenotípicos predominantes son los del virus BSBMV (Rush y Heidel, 1995).

Estructura Genómica y Biología Molecular del virus BSBM

En un principio, debido a las similitudes de los síntomas producidos por los virus BSBMV y BNYVV, se especuló que el virus BSBMV podría ser sólo una cepa del virus BNYVV (Rush, French, y Heidel, 1993); pero en 1997 la caracterización del virus BSBMV no dejó duda que se trataba de un virus diferente. Este fue descrito como un virus rígido en forma cilíndrica, de una medida de 19 nm. de ancho y un rango de 50 a 400 nm. de largo.

El genoma del virus BSBMV está conformado por cuatro cadenas sencillas de RNA poliadeniladas.

La organización genética del virus BSBMV es idéntica a la del virus BNYVV, sin embargo estos virus difieren considerablemente en sus secuencias de bases. Se ha descrito que las secuencias de bases de los diferentes RNAs de los virus BNYVV y BSBMV se encuentran en el rango de 35% al 77% de similitud. Si se compara la secuencia de nucleótidos entre los virus BSBMV y BNYVV sólo difieren en un 15% y en la secuencia de aminoácidos, menos de un 10%. Los RNA1 y RNA2 del virus BSBMV y los RNA1 y RNA2 del virus BNYVV tienen una similitud del 65% al 83% respectivamente. El RNA1 y el RNA2 del virus BSBMV tienen un tamaño de 6.7 y 4.6 Kb respectivamente y se cree que sus productos proteicos, participan en la infección y

replicación viral. Las secuencias del RNA3 y del RNA4 y el gen la proteína rica en cisteína (RNA2) tienen una similitud de 23% a 43% con el mismo tipo de RNAs del virus BNYVV, el RNA3 de 1.8 y el RNA4 tiene un tamaño de 1.2 Kb. El RNA3 del virus BSBMV codifica para una proteína de 25 kDa asociada a los síntomas foliares y a la proliferación de las raíces. El RNA4 del virus BSBMV codifica para una proteína que es esencial para la transmisión eficiente en *P. betae*. (Tamada y Abe, 1989) [Figura #11] Las diferencias en la sintomatología producidas por los virus BSBMV y BNYVV pueden resultar de las variaciones genotípicas entre los RNA3 y RNA4 respectivamente (Lee, Telford, Batten, Schlthof y Rush, en prensa).

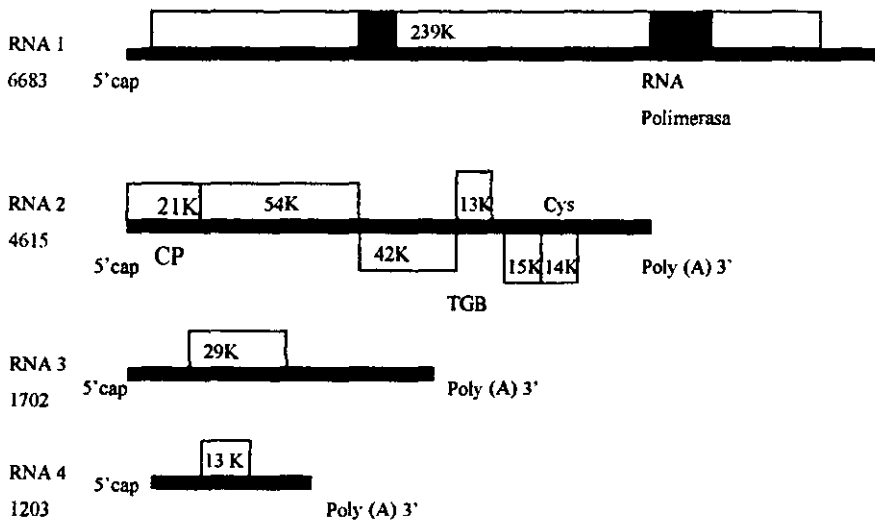


Fig. #11 Organización genómica de las cuatro cadenas de RNA del virus BSBMV. Cada cuadro representa los marcos de lectura abierta ORFs, los pequeños rectángulos en negro al final de los rectángulos representan las cadenas de 3' poli A; la K representa los tamaños de los productos polipeptídicos en unidades de kDa; CP es la proteína de la cápside; TGB bloque de triples genes; Cys Proteína rica en cisteína.

Justificación

Debido a las similitudes que el virus BNYVV y el virus BSBMV comparten, la amplia distribución que el virus BSBMV presenta en las áreas productoras de remolacha de todo el país, de que ambos virus son transmitidos por el mismo vector; del grado de variación en la virulencia de sus cepas, de la posible interacción con el virus BNYVV u otros patógenos contenidos en el suelo y tomando en cuenta los grandes daños económicos que el virus BNYVV ha causado a la industria azucarera. Se considera de suma importancia realizar investigaciones detalladas acerca del comportamiento del virus BSBMV.

La imposibilidad de identificar un campo contaminado con BSBMV o BNYVV a simple vista, a menos que los síntomas foliares se hayan desarrollado, dificulta la rápida detección de los patógenos dentro de los campos de cultivo; es por este motivo que se hace necesaria la búsqueda de métodos eficaces para su detección, esto ayudaría a establecer métodos adecuados para las prácticas agrícolas y un mejor manejo de los cultivos infectados. En la actualidad se desconoce el tipo de distribución que estos patógenos tienen dentro de los campos de cultivo es por este motivo que este trabajo tiene como objetivo investigar la distribución de estos dos patógenos dentro de los campos de cultivo y con esto reconocer los sitios de infección.

Objetivo General:

Determinar la distribución del virus BSBMV y del virus BNYVV en los principales cuatro estados productores de remolacha azucarera en los Estados Unidos.

Objetivos particulares:

1. Detectar la presencia del virus BSBMV en cuatro campos de cultivo situados en los estados de Minesota, Colorado, Dakota del Norte y Texas
2. Detectar la presencia del virus BNYVV en cuatro campos de cultivo situados en los estados de Minesota, Colorado, Dakota del Norte y Texas
3. Determinar la distribución del virus BSBMV en cuatro campos de cultivo situados en los estados de Minesota, Colorado, Dakota del Norte y Texas.
4. Determinar la distribución del virus BNYVV en cuatro campos de cultivo situados en los estados de Minesota, Colorado, Dakota del Norte y Texas.

Material y Métodos

Sitios de Muestreo

Para este trabajo se eligieron cuatro campos de cultivo localizados en cuatro diferentes estados representativos de las dos regiones productoras de remolacha más importantes de la Unión Americana. La región del Alto Medio Oeste que representa la zona de mayor producción de remolacha y la región de las Grandes Planicies por ser la zona de mayor extensión geográfica de producción de remolacha. A cada campo de cultivo se le denominó por el apellido de sus dueños, así contamos con el campo de cultivo# 1 llamado Bosch en el estado de Minnesota, con una área muestreada de 32.2 hectárea; el campo de cultivo#2 llamado Kammerzel en el estado de Colorado, con un área muestreada de 26.66 hectáreas; campo de cultivo#3 al cual se le designó el nombre de Scholl, se encuentra en el estado de Dakota del Norte y el área muestreada fue de 32.32 hectáreas y el campo de cultivo# 4 llamado Sección Sur, localizado en los terrenos de la Estación de Experimentación Agrícola en Texas, TAES en sus siglas en inglés (Texas Agricultural Experimental Station) Este campo de cultivo cuenta con una área de 18,18 hectáreas muestreadas.

Toma de Muestras.

La toma de muestras en los campos de Bosch, Kammerzel y Scholl, se llevó a cabo durante los meses de agosto y septiembre del año de 1999 y el muestreo de la sección sur se realizó en el mes de agosto del año 2000 ambos con la ayuda del equipo del laboratorio de fitopatología del TAES. Se realizaron dos clases de muestreo; uno del terreno completo designado como muestreo general y otro en un área de 404 m² dentro del mismo terreno llamado muestreo intensivo. Los terrenos fueron cuadrículados por medio del sistema de GPS (Sistema de Posición Global) y también con de este sistema se localizaron los puntos de muestreo. Las dimensiones de las áreas muestreadas de estos terrenos, variaron según el área cultivada y la orografía del campo de cultivo. Para el campo Bosch el muestreo se realizó cada 31.69 m entre capa punto y para el muestreo intensivo cada 3.81 m, para el campo Kammerzel el muestreo se llevó de la siguiente manera, las primeras muestras, designadas A y B se tomaron a cada 31.69 m, las muestras de suelo designadas C, D, E, a cada 15.84 m y las muestras de suelo designadas F, G, a cada 31.69 m; y el muestreo intensivo cada 3.81m. En el campo llamado Scholl se realizó un muestreo cada 31.69 m y no se realizó muestreo intensivo debido a que el terreno fue cosechado antes del tiempo del muestreo y el campo llamado Sección Sur se muestreo cada 31.69 m y el muestreo intensivo cada 3.048 m.

Las muestras de suelo fueron tomadas de la siguiente manera: en cada punto de muestreo se sacó una remolacha y el suelo de la parte de alrededor de las raíces (rizósfera) fue colectado en bolsas de plástico con su número de muestra. Cada muestra fue de aproximadamente 250 g y las bolsas fueron empaquetadas en cajas y mandadas por correo a TAES en Texas, donde los suelos fueron puestos a secar y después molidos con la ayuda de un mazo y guardados en cajas de cartón hasta ser sembrados.

Esterilización

Cada remolacha fue sacada con la ayuda de pala y azadón (previamente esterilizados a una temperatura de 90 °C por 25 min). Para el cultivo de las remolachas en los suelos colectados se llevó un estricto control de esterilización, los conos donde se plantaron las semillas de remolacha en los suelos inoculados fueron lavados y puestos a reposar por dos días en una solución de hipoclorito al 20%, al depositar la muestra de inoculante, cada una de las muestra fue manejada por separado abriendo las bolsas de las muestras una por una y cerrándolas inmediatamente después de que cada muestra fue tomada, las manos fueron lavadas con jabón entre la toma de cada una de las muestras. Las gradillas en las cuales fueron colocados los conos ya sembrados, también fueron puestas a reposar en una solución de hipoclorito al 20 % por dos días. Las mesas de malla de metal en las cuales fueron puestas las gradillas dentro del invernadero, fueron lavadas con agua y jabón y esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio al 20 % con una esponja. El suelo utilizado para sembrar las muestras fue esterilizado en hornos a 170 °C

por 24 hrs. Las muestras de raíces para la detección del patógeno fueron tomadas con las manos y las manos fueron lavadas con jabón cada que se tomaba una nueva muestra.

Siembra de las muestras de suelo

Para la siembra de las muestras de suelo colectado, fueron utilizadas 10 bolsas de suelo marca libre Wall-Mart, mezcladas con arena de río en una proporción de 1 a 1/3 de arena y esterilizadas a una temperatura de 170°C por 24 hrs en contenedores cilindricos de 4 cm de diámetro por 17 cm de largo (Super Cell Cone-tainers Stuewe and Sons, Inc., Corvallis, OR) 0.75g de musgo fue colocado en el fondo de los contenedores para evitar que el suelo se saliera por los orificios de drenaje, después fueron llenados hasta la mitad con 125 g de suelo esterilizado y después se agregó 30 g del suelo muestreado, se plantaron 5 semillas de remolacha por cada contenedor de la variedad Beta-1395, las semillas fueron cubiertas por 20 g de arena de río; estos contenedores fueron puestos en gradillas y colocados en mesas en el invernadero de TAES a una temperatura aproximada de 20 °C. Veinte días después de su siembra cada contenedor fue tratado con 30 ml de Tachigarent, un fungicida que ayuda a que las plántulas no sean atacadas por el hongo *Aphanomais* cuando están emergiendo. Este tratamiento de 30 ml de Tachigarent sólo fue utilizado para los contenedores del muestreo intensivo del campo de cultivo llamado Bosch; para los contenedores de los demás muestreos fueron utilizadas semillas de remolacha variedad *Beta* llamadas Tach-35 las cuales estaban recubierta por una pasta de Tachegarent.

Los contenedores cilindricos fueron regados dos veces al día cuidando de no contaminar entre cada uno de los conos con las gotas de agua regadas a mucha presión y fertilizados una vez a la semana con fertilizante llamado "Peter's proporción 20/20" a demás de que a las tres o cuatro semanas de emergencia en cada contenedor se colocó un fertilizante de lenta liberación llamado "Osmocote". Las plantas fueron fumigadas contra ácaros e insectos con un químico llamado M-Pede cada semana (figura 12).



Fig #12 Gradillas con remolachas cultivadas en el invernadero e inoculadas con muestras de los suelos colectados en los campos de los sitios de estudio

Toma de muestra de las raíces.

La toma de muestra de las raíces fue llevada a cabo después de 16 semana de haberse plantado las semillas de remolachas en los contenedores cilíndricos inoculados con las muestras de suelo de los sitios de estudio y cultivadas en el invernadero. Este es el tiempo adecuado para permitir la colonización de *P. betae* y la infección del virus, en el caso de que *P. betae* esté presente en el suelo (Gerik, 1992). Las muestras de las raíces fueron tomadas de la siguiente manera: cada remolacha fue sacada completamente del contenedor cilíndrico y se tomaron muestras de raíces de la punta, la parte media y la base de la remolacha, (aproximadamente 2 g). Cada remolacha fue regresada a su contenedor y las raíces fueron lavadas con agua corriente y colocadas en bolsas de plástico debidamente numeradas y puestas en refrigeración a 4°C para su posterior análisis.

ANÁLISIS DE ELISA

Para el análisis de las muestras se utilizó la técnica de DAS-ELISA "Doble Sándwich Enzyme-linked Immunosorbent Assayed", para determinar la presencia o ausencia de BSBMV y BNYVV. El análisis se llevó a cabo en placas de micro titulación de PVC (Falcon) [figura#15], las placas se cubrieron con 50 μ l de inmunoglobulina G (IgG) contra el virus BSBMV e IgG biotilizada (IgG-b); ambas fueron obtenidas en el laboratorio de fitopatología del TAES con el procedimiento descrito por Heidel y Rusch (1994). El antisuero contra el virus BNYVV fue adquirido en la compañía Bioreba, Inc., Chapel Hill, NC. Cada antisuero fue diluido, en una proporción de 1 μ g/ml en una solución amortiguadora salina de fosfato 0.1M pH 7.3 (PBS) e incubados a una temperatura de 37 °C por 3 hrs. Cada placa fue lavada 10 veces en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.02 M pH 7.6, con cloruro de sodio 0.015 M y 0.05% [v/v] Tween 20 (WB) y secada al aire, después se le agregó solución de WB mas 1% suero de albúmina de bovino (BWB) (para bloquear los poros que quedaron libres) e incubados a 37 °C por 2 hrs. Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera: aproximadamente 1 g de raíces fueron molidas con un moto rotor en 1 ml de solución amortiguadora de BWB (1:10 w/v) y colocadas en tubos "ependorf" de 1.5 ml y puestos en hielo. 50 μ l de las muestras numerada fue colocada en cada uno de los espacios de las placas, también fueron colocadas muestras control (raíces sanas, y raíces

contaminadas con BSBMV Y BNYVV, hojas de *Chenopodium quinoa* inoculadas con los virus BNYVV Y BSBMV (Figura #14) y hojas de *Chenopodium quinoa sp* sanas).

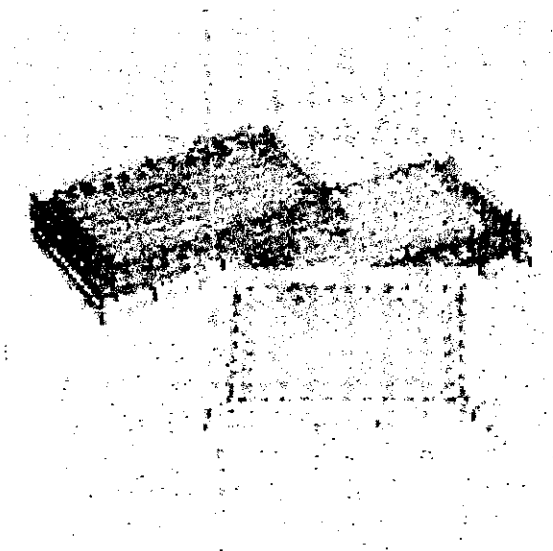


Fig. #14. *Chenopodium quinoa* inoculadas con el virus BNYVV para ser utilizadas como control en el análisis de ELISA

Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C, al día siguiente las placas fueron lavadas 10 veces en la solución amortiguadora de WB y secadas, después se les colocó 50 µl de antisuero biotilado “BSBMV Ig-biotina” y “BNYVV Ig-biotina” en los pozos de sus respectivas placas, diluido a una concentración de 1µl/ml en una solución amortiguadora de BWB , e incubado por tres horas a 37 °C. Nuevamente las palcas fueron lavadas diez veces en solución amortiguadora de WB y secadas, en seguida se les añadió la enzima Fosfatasa alcalina conjugada con avidina (Sigma ExtAvidin

#E2636) diluida de acuerdo a las recomendaciones del fabricante 0.16 $\mu\text{l/ml}$ en la solución amortiguadora de BWB e incubados 37 °C por 2 hrs. De nuevo las placas fueron lavadas en solución amortiguadora de WB y secadas, para finalmente añadirles el sustrato tabletas de sustrato de fosfatos (fosfato p-nitrofenyl, 1.0 mg/ml en 10% de dietanolamida, pH 9.8; Sigma 104 Phosphate Substrate Tablets, # 104/105). Para las placas de BSBMV el tiempo de incubación fue de 15 a 30 min a temperatura ambiente (25 °C aproximadamente) y en la oscuridad; para las placas de BNYVV el tiempo de incubación fue de 1 a 2 hrs, a temperatura ambiente (25°C aprox.) y en la oscuridad o hasta que los controles positivos reaccionaran al sustrato; después de reaccionar con el sustrato cada placa fue leída en un espectrofotómetro lector de microplacas para determinar su densidad óptica "Dynatech MR300" a 410 nm, se consideraron como valores positivos tres veces el rango de los valores de absorbancia de las muestras control de raíces sanas.

Fig #15 Placas de PVC utilizadas para los análisis de la técnica de ELISA.



Análisis de RT-PCR

La técnica de RT-PCR "Reverse Transcriptase-Polimerasa Chain Reaction" Fue utilizada para corroborar los datos de algunas muestras analizadas por medio de la técnica ELISA. El análisis se realizó de la siguiente manera: primero se obtuvo la extracción total de RNA. Se lavaron con agua corriente tres gramos de raíces de las muestras a analizar, estas se muelen en un mortero previamente esterilizado con 2 ml de solución amortiguadora de extracción; después con ayuda de una pipeta se transfirió 1 ml de la mezcla de raíces molidas y a un tubo esterilizado ependorf de 2 ml se le agrega 1.0 ml de fenol, proporción 5:1, se agitan en el vórtex por 10 seg, después se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm; enseguida se recupera la fase superior acuosa del centrifugado, esta se transfiere a un tubo esterilizado ependorf, a esta fase se agrega 1 ml de fenol : cloroformo : alcohol isoamilico, proporción 25:24:1, se agita en el vórtex por 10 seg y se centrifuga por 10 min a 14,000 rpm; después se recupera la fase superior acuosa del centrifugado y se transfiere a un tubo de cristal córtex de 15 ml y se agrega 2.5 volúmenes de etanol frío a una concentración de 70%, se centrifuga a 10,000 rpm por 10 min; se descarta toda la fase acuosa y la fase sólida se disuelve en 1.5 ml de una solución concentración 3M de Acetato de Sodio PH5.6; esto se transfiere a un tubo de ependorf de

1.5 ml y se centrifuga a 14,000 rpm por 10 min: se descarta la fase acuosa y la fase sólida se disuelve en 0.5 ml de agua esterilizada y desionizada y se le agrega 1ml de alcohol frío a una concentración de 100%, se deja reposar por 20 min a una temperatura de -70°C por la precipitación del RNA; después se centrifuga a 14,000 rpm por 10 min. se descarta la fase acuosa y la fase sólida se disuelve en 75 μl de agua DEPC, 0.5 μl de RNA inhibidor y 0.5 μl de DTT.

cDNA

La técnica para la obtención del cDNA se realizó con el Kit Superscrip Preamplication System for first-Strain cDNA Síntesis, fabricado por la compañía Life-Technologies. Primero se preparó la mezcla de *primers* de la siguiente manera: a un tubo de 0.5 ml de tubo de ependorf se le agrega 5.0 μl de Agua DEPC, 1.0 μl de 10nM dNTPs, 1.0 μl de Oligo dT, 6.0 μl del template de la extracción total de RNA, se incuba a 65°C por 5 min, en el Termocicor. Al terminar el ciclo se pone en hielo por 1 min. y se hace la Mezcla de la Reacción de la siguiente manera: 2.0 μl de 10X solución amortiguadora, 4.0 μl de 25 mM MgCl_2 , 2.0 μl de 0.1 M de DTT, 1.0 μl RNAsa Inhibidor, y 9.0 μl de la mezcla anterior del *primer*. Se mezcla con suavidad, se colecta con una centrifugación breve y se le agrega 1.0 μl de la enzima Superscrip II RT se incuba a 42°C por 50 min en el termociclo y se termina con 15 min a 70°C , se enfría en hielo por 2 min. y se le agrega 1.0 μl de H RNAsa se incuba 20 min a 37°C . Se conserva a -20°C .

RT-PCR

La técnica de RT-PCR se realizó con el kit Elongase Amplification System fabricado por la compañía Life-Technologies, y se utilizó de la siguiente manera: a un tubo epindorf de 0.5 ml se le agregó 35.5 μ l de agua DEPC, 5.0 μ l de la solución amortiguadora A y 5.0 μ l de la solución amortiguadora B, 1.0 μ l de 10nM de dNTPs, 1.0 μ l del *primer* G1972F y 1.0 μ l del primer G1973R, 1.0 μ l del template cDNA, se incubó en el termociclo a 95 $^{\circ}$ C por 1 min y caliente se le agrega 0.5 μ l de la enzima Elongasa, toda esta mezcla se pone en el termociclo en el siguiente programa: 30 seg a 94 $^{\circ}$ C, 30 seg a 56 $^{\circ}$ C, 2 min a 68 $^{\circ}$ C, se repiten estas temperaturas 36 veces y termina con el ciclo a 4 $^{\circ}$ C. Se conserva a una temperatura de -20 $^{\circ}$ C.

Gel de Agarosa al 1%

Se prepara un gel de agarosa al 1% diluida una solución amortiguadora de TAE 1%, se calienta en el microondas por 3 min a máxima temperatura. Después se deja enfriar a temperatura ambiente por 15 min. y se le agrega 0.5 μ l de Etidio de bromuro, se deposita en las cajas para electroforesis y se deja enfriar por 30 min. Después se colocan cada una

de las muestras en los orificios del gel y se corre a 120 Voltios por 1 hr. Después estos geles son colocados bajo una lámpara de rayos ultravioleta para que se observe su fluorescencia y se les toma una fotografía, con una cámara *polaroid* y película sensible a la luz ultravioleta.

Análisis Estadísticos. Los datos colectados de los análisis de ELISA aplicados a las muestras colectadas, que nos indican la presencia o ausencia de los virus fueron analizados por una prueba estadística de métodos noparamétricos χ^2 y T-test dentro del programa SAS System.

Resultados.

Campo de Cultivo Bosch.

En el campo de cultivo Bosch en la colecta general se obtuvo un total de 80 muestras de suelo en las 32.2 hectáreas del campo de cultivo situado en el estado de Minesota. El total de las muestras fueron analizadas por medio de la prueba serológica ELISA, obteniendo los siguientes resultados: Los antígenos del virus BNYVV se detectaron en 37 de 80 muestras para dar un porcentaje de incidencia del 46.75%, mientras que los antígenos del virus BSBMV se detectaron en seis muestras con un porcentaje de incidencia del 7.1%; a su vez 23 muestras positivas se registraron para ambos virus, el 26.92% de incidencia; 14 muestras resultaron negativas para ambos virus con una incidencia del 17.5% (Tabla 2 y figura #16).

Para el muestreo intensivo donde se analizaron 156 muestras de suelo colectadas en 404 m², se encontró que 26.92% es decir 42 de las 156 muestras fueron positivas para el virus BNYVV, 10 positivas para BSBMV un 6.41%, ocho se registraron con ambos virus presentes en un 5.12% de incidencia y en 96 muestras se encontró la ausencia de ambos virus BNYVV y BSBMV con el es decir el 61.53% (tabla 2 y figura #17). De acuerdo a los resultados anteriores el virus BNYVV fue el que se presentó con mayor incidencia en este campo tanto para el muestreo general con un 46.75% que para el muestreo intensivo con un 26.92%. En contraste el virus BSBMV presentó una incidencia del 7.1% para el muestreo general y una incidencia del 6.41%. (Figuras # 16 y 17).

Tabla #2 Datos de las lecturas de las densidades ópticas obtenidas en los análisis de ELISA del campo de cultivo Bosch régimen general; BN O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpo del virus BNYVV. R.O.D.1 Referencia de las lecturas de densidad óptica que es tres veces el valor de densidad óptica de las muestras control de raíces sanas; BS O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpos del virus BSBMV. BN Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BNYVV. BS Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BSBMV; Infección : 1 ambos virus presentes, 2 ningún virus presente, 3 antígenos del virus BSBMV presentes, 4 antígenos del virus BNYVV presentes.

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
A-1	0.593	0.153	0.366	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
A-2	0.18	0.153	0.352	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
A-3	0.090	0.153	0.022	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
A-4	0.205	0.153	0.064	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
A-5	0.221	0.153	0.462	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
A-6	0.277	0.153	0.216	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
A-7	0.154	0.153	0.175	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
A-8	0.218	0.153	0.271	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
A-9	0.349	0.153	0.291	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
A-10	0.09	0.153	0.237	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
B-1	0.065	0.153	0.212	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
B-2	0.083	0.153	0.29	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
B-3	0.121	0.153	0.365	0.309	0	1	3	BOSH Gen.
B-4	0.261	0.153	0.221	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
B-5	0.148	0.153	0.228	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
B-6	0.203	0.153	0.182	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
B-7	0.178	0.153	0.164	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
B-8	0.289	0.153	0.252	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
B-9	0.206	0.153	0.239	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
B-10	0.079	0.153	0.289	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
C-1	0.32	0.153	0.245	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
C-2	0.086	0.153	0.273	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
C-3	0.171	0.153	0.189	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
C-4	0.307	0.153	0.276	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
C-5	0.079	0.153	0.3	0.309	0	1	3	BOSH Gen.
C-6	0.276	0.153	0.454	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
C-7	0.598	0.153	0.071	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
C-8	0.093	0.153	0.266	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
C-9	0.081	0.153	0.315	0.309	0	1	3	BOSH Gen.
C-10	0.062	0.153	0.245	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
D-1	0.402	0.153	0.57	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
D-2	0.255	0.153	0.302	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
D-3	0.182	0.153	0.173	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
D-4	0.171	0.153	0.682	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
D-5	0.141	0.153	0.24	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
D-6	0.149	0.153	0.114	0.309	0	0	2	BOSH Gen.

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
D-7	0.206	0.153	0.342	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
D-8	0.329	0.153	0.119	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
D-9	0.209	0.153	0.492	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
D-10	0.185	0.153	0.252	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
E-1	0.683	0.153	0.69	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
E-2	0.177	0.153	0.215	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
E-3	0.326	0.153	0.065	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
E-4	0.114	0.153	0.151	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
E-5	0.186	0.153	0.186	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
E-6	0.21	0.153	0.322	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
E-7	0.183	0.153	0.23	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
E-8	0.157	0.153	0.076	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
E-9	0.07	0.153	0.44	0.309	0	1	3	BOSH Gen.
E-10	0.206	0.153	0.172	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
F-1	0.157	0.153	0.516	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
F-2	0.274	0.153	0.172	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
F-3	0.166	0.153	0.136	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
F-4	0.094	0.153	0.399	0.309	0	1	3	BOSH Gen.
F-5	0.228	0.153	0.434	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
F-6	0.255	0.153	0.377	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
F-7	0.225	0.153	0.231	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
F-8	0.356	0.153	0.418	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
F-9	0.178	0.153	0.301	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
F-10	0.273	0.153	0.344	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
G-1	0.185	0.153	0.315	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
G-2	0.233	0.153	0.252	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
G-3	0.313	0.153	0.35	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
G-4	0.153	0.153	0.171	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
G-5	0.307	0.153	0.18	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
G-6	0.109	0.153	0.196	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
G-7	0.294	0.153	0.222	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
G-8	0.255	0.153	0.162	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
G-9	0.272	0.153	0.038	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
G-10	0.178	0.153	0.1	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
H-1	0.156	0.153	0.182	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
H-2	0.142	0.153	0.385	0.309	0	1	3	BOSH Gen.
H-3	0.426	0.153	0.276	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
H-4	0.179	0.153	0.156	0.309	1	0	4	BOSH Gen.
H-5	0.125	0.153	0.14	0.309	0	0	2	BOSH Gen.
H-6	0.212	0.153	0.453	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
H-7	0.248	0.153	0.318	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
H-8			0.499	0.309	0	1	3	BOSH Gen.
H-9	0.164	0.153	0.529	0.309	1	1	1	BOSH Gen.
H-10	0.26	0.153	0.317	0.309	1	1	1	BOSH Gen.

Tabla #3 Datos de las lecturas de las densidades ópticas obtenidas en los análisis de ELISA del campo de cultivo Bosch régimen intensivo; BN O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpo del virus BNYVV. R.O.D.1 Referencia de las lecturas de densidad óptica que es tres veces el valor de densidad óptica de las muestras control de raíces sanas; BS O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpos del virus BSBMV. BN Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BNYVV. BS Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BSBMV; Infección : 1 ambos virus presentes, 2 ningún virus presente, 3 antígenos del virus BSBMV presentes, 4 antígenos del virus BNYVV presentes.

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
B-101	0.123	0.198	0.128	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-102	0.091	0.198	0.1	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-103	0.564	0.198	0.145	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-104	0.161	0.198	0.211	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-105	0.147	0.198	0.162	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-106	0.122	0.198	0.35	0.26	0	1	3	BOSH intensi
B-107	0.124	0.198	0.117	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-108	0.289	0.198	0.471	0.26	1	1	1	BOSH intensi
B-109	0.251	0.198	0.06	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-110	0.119	0.198	0.12	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-111	0.118	0.198	0.096	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-112	0.102	0.198	0.225	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-113	0.112	0.198	0.082	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-114	0.101	0.198	0.239	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-115	0.122	0.198	0.07	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-116	0.113	0.198	0.117	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-117	0.03	0.198	0.128	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-118	0.037	0.198	0.327	0.26	0	1	3	BOSH intensi
B-119	0.531	0.198	0.202	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-120	0.012	0.198	0.120	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-121	0.118	0.198	0.094	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-122	0.1	0.198	0.292	0.26	0	1	3	BOSH intensi
B-123	0.136	0.198	0.116	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-124	0.13	0.198	0.117	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-125	0.455	0.198	0.094	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-126	0.011	0.198	0.112	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-201	0.102	0.198	0.211	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-202	0.332	0.198	0.135	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-203	0.18	0.198	0.11	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-204	0.816	0.198	0.376	0.26	1	1	1	BOSH intensi
B-205	0.303	0.198	0.1	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-206	1.096	0.198	0.356	0.26	1	1	1	BOSH intensi
B-207	0.245	0.198	0.097	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-208	0.172	0.198	0.167	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-209	0.094	0.198	0.08	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-210	0.144	0.198	0.144	0.26	0	0	2	BOSH intensi

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
B-211	0.136	0.198	0.107	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-212	0.373	0.198	0.112	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-213	0.708	0.198	0.135	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-214	0.613	0.198	0.184	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-215	0.051	0.198	0.145	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-216	0.081	0.198	0.109	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-217	0.092	0.198	0.116	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-218	0.04	0.198	0.101	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-219	0.093	0.198	0.107	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-220	0.04	0.198	0.089	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-221	0.123	0.198	0.011	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-222	0.067	0.198	0.308	0.26	0	1	3	BOSH intensi
B-223	0.125	0.198	0.153	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-224	0.126	0.198	0.188	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-225	0.072	0.198	0.087	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-226	0.291	0.198	0.118	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-301	1.302	0.198	0.442	0.26	1	1	1	BOSH intensi
B-302	0.388	0.198	0.137	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-303	0.123	0.198	0.188	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-304	0.414	0.198	0.115	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-305	0.287	0.198	0.088	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-306	0.264	0.198	0.139	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-307	0.133	0.198	0.124	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-308	0.418	0.198	0.055	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-309	0.126	0.198	0.124	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-310	1.701	0.198	0.16	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-311	1.327	0.198	0.34	0.26	1	1	1	BOSH intensi
B-312	0.120	0.198	0.077	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-313	0.51	0.198	0.056	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-314	0.012	0.198	0.068	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-315	0.097	0.198	0.102	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-316	0.098	0.198	0.102	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-317	0.243	0.198	0.118	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-318	0.174	0.198	0.052	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-319	0.127	0.198	0.118	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-320	0.034	0.198	0.012	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-321	0.122	0.198	0.116	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-322	0.656	0.198	0.082	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-323	0.059	0.198	0.102	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-324	0.113	0.198	0.078	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-325	0.068	0.198	0.09	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-326	1.341	0.198	0.214	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-401	0.075	0.198	0.377	0.26	0	1	3	BOSH intensi
B-402	0.068	0.198	0.106	0.26	0	0	2	BOSH intensi
B-403	0.119	0.198	0.246	0.26	0	0	2	BOSH intensi

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
B-404	1.184	0.198	0.068	0.26	1	0	4	BOSH intensi
B-405	1.029	0.291	0.095	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-406	0.478	0.291	0.106	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-407	0.741	0.291	0.204	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-408	0.716	0.291	0.164	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-409	0.725	0.291	0.154	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-410	0.93	0.291	0.158	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-411	1.475	0.291	0.12	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-412	1.409	0.291	0.141	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-413	0.954	0.291	0.111	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-414	0.172	0.291	0.079	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-415	0.139	0.291	0.12	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-416	0.109	0.291	0.101	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-417	0.118	0.291	0.092	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-418	0.089	0.291	0.067	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-419	0.819	0.291	0.179	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-420	0.109	0.291	0.101	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-421	0.195	0.291	0.119	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-422	0.804	0.291	0.112	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-423	0.943	0.291	0.103	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-424	0.097	0.291	0.053	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-425	0.123	0.291	0.078	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-426	0.155	0.291	0.124	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-501	0.188	0.291	0.141	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-502	0.579	0.291	0.183	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-503	0.289	0.291	0.111	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-504	0.13	0.291	0.053	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-505	0.785	0.291	0.416	0.21	1	1	1	BOSH intensi
B-506	0.122	0.291	0.097	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-507	0.284	0.291	0.095	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-508	0.335	0.291	0.093	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-509	0.313	0.291	0.091	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-510	0.624	0.291	0.1	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-511	0.554	0.291	0.057	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-512	0.089	0.291	0.054	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-513	0.179	0.291	0.061	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-514	0.064	0.291	0.114	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-515	0.059	0.291	0.101	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-516	0.136	0.291	0.131	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-517	0.116	0.291	0.05	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-518	0.065	0.291	0.044	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-519	0.099	0.291	0.057	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-520	0.053	0.291	0.085	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-521	0.026	0.291	0.099	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-522	0.087	0.291	0.066	0.21	0	0	2	BOSH intensi

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
B-523	0.138	0.291	0.072	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-524	0.084	0.291	0.088	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-524	0.213	0.291	0.08	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-526	0.12	0.291	0.12	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-601	0.24	0.291	0.076	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-602	0.064	0.291	0.513	0.21	0	1	3	BOSH intensi
B-603	1.048	0.291	0.419	0.21	1	1	1	BOSH intensi
B-604	0.226	0.291	0.25	0.21	0	1	3	BOSH intensi
B-605	0.237	0.291	1.832	0.21	0	1	3	BOSH intensi
B-606	0.77	0.291	0.246	0.21	1	1	1	BOSH intensi
B-607	0.143	0.291	0.128	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-608	0.869	0.291	0.112	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-609	0.078	0.291	0.121	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-610	0.106	0.291	0.075	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-611	0.187	0.291	0.072	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-612	0.015	0.291	0.197	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-613	0.433	0.291	0.132	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-614	0.491	0.291	0.173	0.21	1	0	4	BOSH intensi
B-615	0.064	0.291	0.367	0.21	0	1	3	BOSH intensi
B-616	0.229	0.291	0.114	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-617	0.049	0.291	0.106	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-618	0.042	0.291	0.076	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-619	0.202	0.291	0.039	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-620	0.107	0.291	0.097	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-621	0.078	0.291	0.111	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-622	0.071	0.291	0.087	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-623	0.039	0.291	0.073	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-624	0.052	0.291	0.276	0.21	0	1	3	BOSH intensi
B-625	0.04	0.291	0.068	0.21	0	0	2	BOSH intensi
B-626	0.056	0.291	0.083	0.21	0	0	2	BOSH intensi

Tabla #4. Frecuencia del virus BSBMV y del virus BNYVV en el campo de cultivo Bosch en el estado de Minesota

Tipo de muestreo	Número de muestras	Virus BSBMV	Virus BNYVV	Antígenos del virus BSBMV y del virus BNYVV encontrados en la misma muestra por la técnica ELISA	Ningún antígeno presente en las muestras analizadas por la técnica de ELISA
General	80	6	37	23	14
Porcentaje de incidencia	-	7.5	46.25	28.75	17.5
Intensivo	156	10	42	8	96
Porcentaje de incidencia	-	6.41	26.92	5.12	61.53

a Indica el tipo de muestreo; b Número total de muestras obtenidas para ese tipo de muestreo; c Datos positivos para los antígenos de BSBMV obtenidos de muestras analizadas por la técnica de ELISA; d Datos positivos para los antígenos de BNYVV obtenidos de muestras analizadas por la técnica de ELISA; e Antígenos del virus BSBMV y del virus BNYVV encontrados en la misma muestra por la técnica ELISA; f Ningún antígeno presente en las muestras analizadas por la técnica de ELISA.

Fig. #16 Porcentaje de incidencia de los virus BSBMV y BNYVV para el muestreo general en el campo de cultivo Boch.

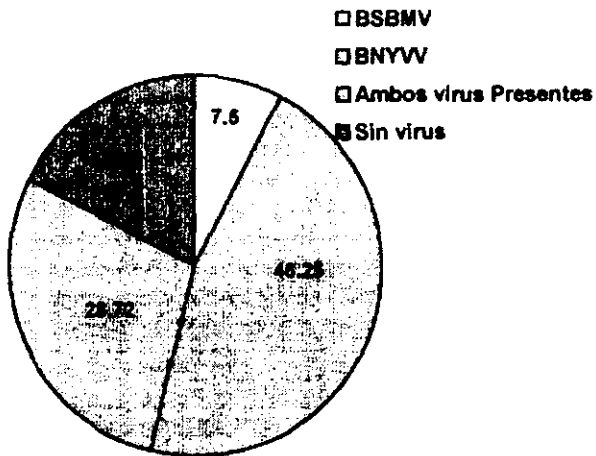
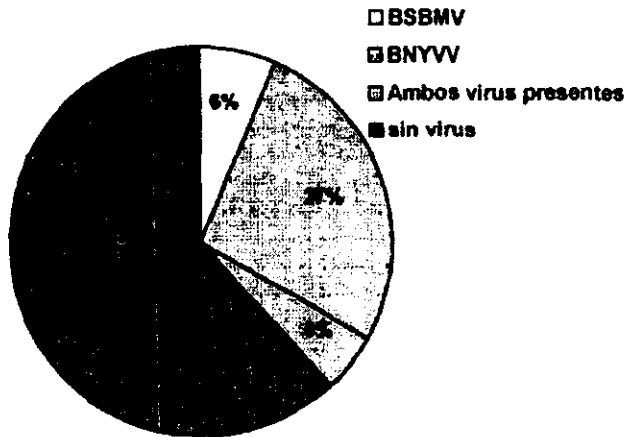


Fig.#17 Porcentaje de incidencia de los virus BSBMV y BNYVV para el muestreo intensivo en el campo de cultivo Bosch.



Campo de Cultivo Kammerzal

En el campo de cultivo llamado Kammerzal localizado en el estado de Colorado, en el muestreo general se obtuvo un total de 59 muestras en las 26.66 hectáreas del campo de cultivo; 15 muestras reaccionaron positivo para los antígenos del virus BSBMV, dando un 25.42% de incidencia; en 10 de las muestras se registraron los antígenos del virus BNYVV, con un 16.94% de incidencia; 5 muestras reaccionaron positivas para ambos virus dando un 8.47% de incidencia y en 29 muestras no se registró ninguno de los antígenos ni para el BSBMV ni para BYNVV (Tabla 7 y Figura #18)

En el muestreo intensivo se obtuvo un total de 70 muestras de las cuales 36 reaccionaron positivas para los antígenos de BSBMV, dando un 51.42% de incidencia; en seis registraron positivas para los antígenos de BNYVV, con un 8.57% de incidencia; 13 registraron positivas para ambos virus, con un 18.57% de incidencia y 15 muestras no reportaron presencia de ninguno de los dos virus. (Tabla 7 y Figura #19) De acuerdo a los resultados anteriores el virus BSBMV fue el que presentó mayor incidencia en este campo tanto para el muestreo general con un 25.42% como para el muestreo intensivo con un 51.42%. En contraste el virus BNYVV presentó una incidencia del 16.94 % para el muestreo general y una incidencia del 8.57% (Figuras # 18 y 19).

Tabla #5 Datos de las lecturas de las densidades ópticas obtenidas en los análisis de ELISA del campo de cultivo Kammerzal régimen general; BN O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpo del virus BNYVV. R.O.D.1 Referencia de las lecturas de densidad óptica que es tres veces el valor de densidad óptica de las muestras control de raíces sanas; BS O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpos del virus BSBMV. BN Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BNYVV. BS Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BSBMV; Infección : 1 ambos virus presentes, 2 ningún virus presente, 3 antígenos del virus BSBMV presentes, 4 antígenos del virus BNYVV presentes.

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
A-1	0.23	0.277	0.087	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
A-2	0.227	0.277	0.083	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
A-3	0.275	0.277	1.235	0.206	1	1	1	Kammerzal Gen
A-4	0.338	0.277	0.129	0.206	1	0	4	Kammerzal Gen
A-5	0.434	0.277	1.839	0.206	1	1	1	Kammerzal Gen
A-6	0.318	0.277	0.211	0.206	1	1	1	Kammerzal Gen
A-7	0.127	0.277	0.173	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
A-8	0.245	0.277	0.224	0.206	0	1	3	Kammerzal Gen
A-9	0.238	0.277	3	0.206	0	1	3	Kammerzal Gen
A-10	0.254	0.277	3	0.206	0	1	3	Kammerzal Gen
A-11	0.168	0.277	0.207	0.206	0	1	3	Kammerzal Gen
B-1	0.497	0.277	0.17	0.206	1	0	1	Kammerzal Gen
B-2	0.262	0.277	0.067	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
B-3	0.639	0.277	0.068	0.206	1	0	4	Kammerzal Gen
B-4	0.178	0.277	0.065	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
B-5	0.077	0.277	0.094	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
B-6	0.193	0.277	0.171	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
B-7	0.104	0.277	0.15	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
B-8	0.317	0.277	0.109	0.206	1	0	4	Kammerzal Gen
B-9	0.128	0.277	0.469	0.206	0	1	3	Kammerzal Gen
B-10	0.17	0.277	0.114	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
B-11	0.095	0.277	0.083	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
C-1	0.136	0.277	0.119	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
C-2	0.122	0.277	0.12	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
C-3	0.122	0.277	0.132	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
C-4	0.302	0.277	0.099	0.206	1	0	4	Kammerzal Gen
C-5	0.102	0.277	0.662	0.206	0	1	3	Kammerzal Gen
C-6	0.162	0.277	0.103	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
C-7	0.257	0.277	0.083	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
C-8	0.078	0.277	0.096	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
C-9	0.265	0.277	0.082	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen
C-10	0.157	0.277	0.071	0.206	0	0	2	Kammerzal Gen

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
C-11	0.104	0.277	2.159	0.206	0	1	3	Karmmezal Gen
D-1	0.109	0.277	0.092	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
D-2	0.089	0.277	0.073	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
D-3	1.458	0.277	0.384	0.206	1	1	1	Karmmezal Gen
D-4	0.101	0.277	0.084	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
D-5	0.083	0.277	0.082	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
D-6	0.065	0.277	0.064	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
D-7	0.095	0.277	0.152	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
D-8	0.139	0.277	0.094	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
D-9	0.11	0.277	0.122	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
D-10	0.093	0.277	0.072	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
D-11	0.094	0.277	0.277	0.206	0	1	3	Karmmezal Gen
E-2	0.792	0.277	0.176	0.206	1	0	4	Karmmezal Gen
E-3	0.063	0.277	0.49	0.206	0	1	3	Karmmezal Gen
E-4	0.203	0.277	0.691	0.206	0	1	3	Karmmezal Gen
E-5	0.114	0.277	2.089	0.206	0	1	3	Karmmezal Gen
E-6	0.118	0.277	3	0.206	0	1	3	Karmmezal Gen
E-7	0.357	0.277	0.075	0.206	1	0	4	Karmmezal Gen
E-8	0.256	0.277	0.291	0.206	0	1	3	Karmmezal Gen
E-9	0.054	0.277	0.063	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
F-3	0.141	0.277	0.073	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
F-4	0.181	0.277	0.075	0.206	0	0	2	Karmmezal Gen
F-5	0.056	0.277	0.267	0.206	0	1	3	Karmmezal Gen
F-6	0.64	0.277	0.07	0.206	1	0	4	Karmmezal Gen
F-7	0.863	0.277	0.058	0.206	1	0	4	Karmmezal Gen
F-8	0.081	0.277	3	0.206	0	1	3	Karmmezal Gen
F-9	0.085	0.277	3	0.206	0	1	3	Karmmezal Gen

Tabla #6 Datos de las lecturas de las densidades ópticas obtenidas en los análisis de ELISA del campo de cultivo Kammerzal régimen intensivo; BN O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpo del virus BNYVV. R.O.D.1 Referencia de las lecturas de densidad óptica que es tres veces el valor de densidad óptica de las muestras control de raíces sanas; BS O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpos del virus BSBMV. BN Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BNYVV. BS Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BSBMV; Infección : 1 ambos virus presentes, 2 ningún virus presente, 3 antígenos del virus BSBMV presentes, 4 antígenos del virus BNYVV presentes.

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
A1	0.112	0.148	0.9	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
A2	0.098	0.148	0.817	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
A3	0.132	0.148	0.849	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
A4	0.486	0.148	0.956	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
A5	0.145	0.148	0.884	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
A6	0.163	0.148	0.786	0.814	1	0	4	karmmezal Int.
A7	0.137	0.148	0.881	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
A8	0.114	0.148	1.889	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
A9	0.095	0.148	0.752	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
A10	0.119	0.148	0.882	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
B1	0.552	0.148	0.865	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
B2	0.121	0.148	0.112	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
B3	0.094	0.148	0.873	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
B4	0.141	0.148	0.894	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
B5	0.097	0.148	0.839	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
B6	0.114	0.148	0.025	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
B7	0.137	0.148	2.026	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
B8	0.109	0.148	0.876	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
B9	0.203	0.148	0.887	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
B10	0.073	0.148	0.394	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
C1	0.803	0.148	1.741	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
C2	0.093	0.148	0.959	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
C3	0.077	0.148	1.612	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
C4	0.062	0.148	0.847	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
C5	0.125	0.148	1.021	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
C6	0.107	0.148	2.077	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
C7	0.091	0.148	0.923	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
C8	0.071	0.148	0.899	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
C9	0.333	0.148	0.874	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
C10	0.092	0.148	0.863	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
D1	0.399	0.148	1.926	0.814	1	1	1	karmmezal Int.

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
D2	0.097	0.148	0.762	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
D3	0.959	0.148	0.749	0.814	1	0	4	karmmezal Int.
D4	0.07	0.148	1.644	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
D5	1.368	0.148	0.752	0.814	1	0	4	karmmezal Int.
D6	0.079	0.148	1.679	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
D7	0.069	0.148	1.374	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
D8	0.065	0.148	0.564	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
D9	0.054	0.148	0.812	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
D10	0.054	0.148	0.72	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
E1	0.987	0.148	0.999	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
E2	0.051	0.148	1.308	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
E3	0.052	0.148	1.457	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
E4	0.064	0.148	1.176	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
E5	0.047	0.148	0.921	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
E6	0.032	0.148	0.881	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
E7	0.05	0.148	0.725	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
E8	0.064	0.148	0.862	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
E9	0.059	0.148	0.745	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
E10	0.055	0.148	0.862	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
F1	0.074	0.148	0.769	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
F2	0.053	0.148	0.687	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
F3	0.067	0.148	1.679	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
F4	0.058	0.148	1.618	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
F5	0.126	0.148	1.232	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
F6	0.66	0.148	0.721	0.814	1	0	4	karmmezal Int.
F7	0.224	0.148	0.751	0.814	1	0	4	karmmezal Int.
F8	0.39	0.148	0.839	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
F9	0.206	0.148	0.721	0.814	1	0	4	karmmezal Int.
F10	0.328	0.148	0.871	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
G1	0.053	0.148	0.78	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
G2	0.093	0.148	0.762	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
G3	0.054	0.148	1.44	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
G4	0.051	0.148	0.74	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
G5	0.054	0.148	0.824	0.814	0	1	3	karmmezal Int.
G6	0.385	0.148	0.855	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
G7	0.472	0.148	1.125	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
G8	0.604	0.148	0.882	0.814	1	1	1	karmmezal Int.
G9	0.066	0.148	0.736	0.814	0	0	2	karmmezal Int.
G10	0.088	0.148	0.824	0.814	0	1	3	karmmezal Int.

Tabla7. Frecuencia del virus BSBMV y del virus BNYVV en el campo de cultivo Kemmerzal en el estado de Colorado.

Tipo de Muestreo	Muestras b	Muestras BSBMV positivas c	Muestras BNYVV positivas d	Antígenos del virus BSBMV y del virus BNYVV encontrados en la misma muestra e	Muestras sin ningún antígeno f
General	59	15	10	5	29
Porcentaje de Incidencia	-	25.42	16.94	8.47	49.15
Intensivo	70	36	6	13	15
Porcentaje de Incidencia	-	51.42	8.57	18.57	21.42

a Indica el tipo de muestreo; b Número total de muestras obtenidas para ese tipo de muestreo; c Datos positivos para los antígenos de BSBMV obtenidos de muestras analizadas por la técnica de ELISA; d Datos positivos para los antígenos de BNYVV obtenidos de muestras analizadas por la técnica de ELISA; e Antígenos del virus BSBMV y del virus BNYVV encontrados en la misma muestra por la técnica ELISA; f Ningún antígeno presente en las muestras analizadas por la técnica de ELISA

Fig.#18 Porcentaje de incidencia de los virus BSBMV y BNYVV para el muestreo general en el campo de cultivo Kammerzal.

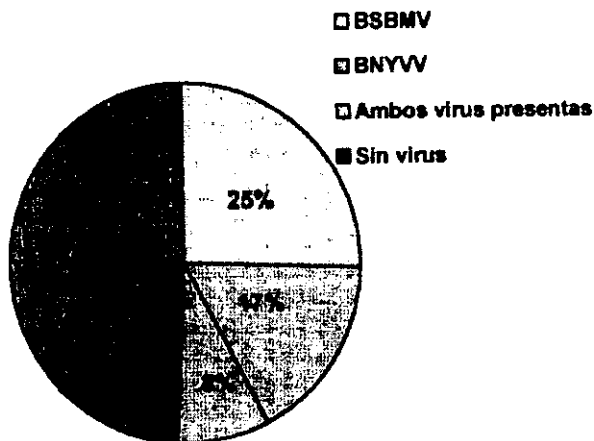
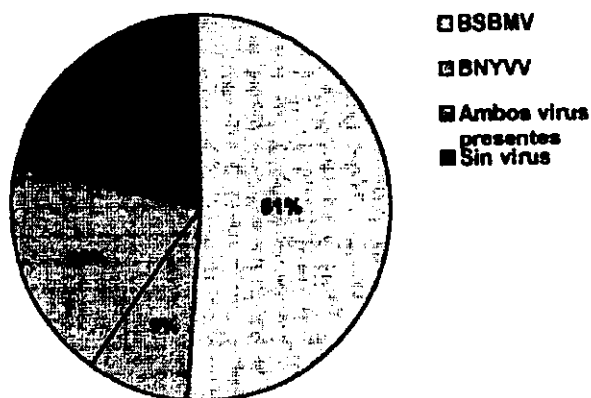


Fig.#19 Porcentaje de incidencia de los virus BSBMV y BNYVV para el muestreo intensivo en el campo de cultivo Kammerzal.



Campo de cultivo South Section

En el campo de cultivo denominado South Section localizado en el estado de Texas se analizaron un total de 45 muestras en una extensión de 18.18 hectárea. En el muestreo general, 27 muestras resultaron positivas para los antígenos del virus BSBMV, con un 60% de incidencia; no se encontraron muestras positivas para los antígenos del virus BNYVV, 3 muestras se presentaron positivas para ambos virus, dando un 6.6% de incidencia; 15 reaccionaron negativas para ambos virus. (Tabla 10 y Figura #20).

Para el muestreo intensivo, de las 100 muestras colectadas en los 404 m² se encontró 47 muestras positivas para los antígenos del virus BSBMV, con un 47% de incidencia; no se registró ninguna muestra positiva para los antígenos del virus BNYVV; y sólo una muestra fue encontrada positiva para ambos virus, con un 1% de incidencia; 52 muestras no registraron presencia de ninguno de los dos virus (Tabla 10 y Figura #21). De acuerdo a los resultados anteriores el virus BSBMV fue el que presentó mayor incidencia en este campo tanto para el muestreo general con un 60% como para el muestreo intensivo con un 47%. En contraste no se encontró ninguna muestra positiva para los antígenos del virus BNYVV, solamente se presentó compartiendo la misma muestra en tres muestras para el muestreo general y el 1 muestra para el muestreo intensivo. (Figuras # 20 y 21).

Tabla #8 Datos de las lecturas de las densidades ópticas obtenidas en los análisis de ELISA del campo de cultivo South Section régimen general; BN O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpo del virus BNYVV. R.O.D.1 Referencia de las lecturas de densidad óptica que es tres veces el valor de densidad óptica de las muestras control de raíces sanas; BS O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpos del virus BSBMV. BN Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BNYVV. BS Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BSBMV; Infección : 1 ambos virus presentes, 2 ningún virus presente, 3 antígenos del virus BSBMV presentes, 4 antígenos del virus BNYVV presentes.

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
SS1	0.017	0.112	1.715	0.095	0	1	3	South Sec. Gen.
SS2	0.021	0.112	1.256	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS3	0.029	0.112	0.073	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS4	0.046	0.112	0.08	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS5	0.059	0.112	0.2	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS6	0.18	0.112	1.722	0.095	1	1	1	South Sec. Gen
SS7	0.044	0.112	1.815	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS8	0.073	0.112	0.386	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS9	0.031	0.112	1.687	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS10	0.082	0.112	1.922	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS11	0.094	0.112	0.243	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS12	0.052	0.112	0.309	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS13	0.044	0.112	0.062	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS14	0.022	0.112	0.343	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS15	0.072	0.112	0.262	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS16	0.009	0.112	0.041	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS17	0.082	0.112	0.062	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS18	0.068	0.112	0.67	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS19	0.023	0.112	0.027	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS20	0.154	0.112	1.465	0.095	1	1	1	South Sec. Gen
SS21	0.058	0.112	0.209	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS22	0.052	0.112	1.154	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS23	0.051	0.112	1.592	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS24	0.052	0.112	0.993	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS25	0.051	0.112	1.399	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS26	0.015	0.112	0.027	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS27	0.075	0.112	0.1	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS28	0.087	0.112	0.062	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS29	0.075	0.112	0.115	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS30	0.063	0.112	0.014	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS31	0.039	0.112	0.005	0.095	0	0	2	South Sec. Gen

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
SS32	0.034	0.112	1.519	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS33	0.051	0.112	0.058	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS34	0.043	0.112	1.414	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS35	0.053	0.112	0.014	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS36	0.055	0.112	0.42	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS37	0.029	0.112	0.018	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS38	0.056	0.112	0.285	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS39	0.067	0.112	0.227	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS40	0.039	0.112	0.028	0.095	0	0	2	South Sec. Gen
SS41	0.127	0.112	0.096	0.095	1	1	1	South Sec. Gen
SS42	0.097	0.112	0.125	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS43	0.064	0.112	0.869	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS44	0.041	0.112	1.746	0.095	0	1	3	South Sec. Gen
SS45	0.076	0.112	0.028	0.095	0	0	2	South Sec. Gen

Tabla #9 Datos de las lecturas de las densidades ópticas obtenidas en los análisis de ELISA del campo de cultivo South Section régimen intensivo; BN O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpo del virus BNYVV. R.O.D.1 Referencia de las lecturas de densidad óptica que es tres veces el valor de densidad óptica de las muestras control de raíces sanas; BS O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpos del virus BSBMV. BN Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BNYVV. BS Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BSBMV; Infección : 1 ambos virus presentes, 2 ningún virus presente, 3 antígenos del virus BSBMV presentes, 4 antígenos del virus BNYVV presentes.

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
A1	0.134	0.315	0.094	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
A2	0.106	0.315	2.145	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
A3	0.13	0.315	2.36	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
A4	0.193	0.315	0.08	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
A5	0.134	0.315	0.035	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
A6	0.156	0.315	1.21	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
A7	0.152	0.315	0.059	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
A8	0.072	0.315	0.035	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
A9	0.202	0.315	0.035	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
A10	0.169	0.315	0.021	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
B1	0.054	0.315	0.013	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
B2	0.104	0.315	1.146	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
B3	0.091	0.315	0.311	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
B4	0.068	0.315	0.056	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
B5	0.268	0.315	0.031	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
B6	0.042	0.315	0.261	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
B7	0.037	0.315	0.333	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
B8	0.103	0.315	0.224	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
B9	0.019	0.315	2.251	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
B10	0.019	0.315	0.035	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
C1	0.361	0.315	2.029	0.114	1	1	1	South Sec. Int.
C2	0	0	2	South Sec. Int.
C3	0.031	0.315	0.19	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
C4	0	0	2	South Sec. Int.
C5	0.037	0.315	1.693	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
C6	0.032	0.315	1.674	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
C7	0.045	0.315	1.667	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
C8	0.098	0.315	0.069	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
C9	0.033	0.315	2.126	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
C10	0	0	2	South Sec. Int.

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
D1	0.08	0.315	0.069	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
D2	0.012	0.315	1.416	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
D3	0.04	0.315	1.693	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
D4	0.021	0.315	0.038	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
D5	0.011	0.315	0.051	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
D6	0.036	0.315	0.072	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
D7	0.091	0.315	1.693	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
D8	0.016	0.315	2.075	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
D9	0.003	0.315	0.957	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
D10	0.255	0.315	0.221	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
E1	0.024	0.315	0.358	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
E2	0.03	0.315	0.039	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
E3	0.024	0.315	1.625	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
E4	0.009	0.315	1.873	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
E5	0.099	0.315	1.758	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
E6	0.121	0.315	0.631	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
E7	0.118	0.315	0.043	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
E8	0.031	0.315	0.15	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
E9	0.021	0.315	2.075	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
E10	0.046	0.315	0.167	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
F1	0.001	0.315	0.113	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
F2					0	0	2	South Sec. Int.
F3	0.01	0.315	1.667	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
F4	0.002	0.315	1.95	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
F5					0	0	2	South Sec. Int.
F6	0.003	0.315	0.039	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
F7	0.012	0.315	0.039	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
F8					0	0	2	South Sec. Int.
F9	0.023	0.315	0.077	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
F10	0.29	0.315	0.033	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
G1	0.009	0.315	0.158	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
G2	0.055	0.315	1.649	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
G3	0.06	0.315	0.147	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
G4	0.01	0.315	0.041	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
G5	0.039	0.315	0.164	0.114	0	1	3	South Sec. Int.
G6	0.013	0.315	0.067	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
G7	0.021	0.315	0.071	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
G8	0.037	0.315	0.016	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
G9	0.081	0.315	0.032	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
G10	0.063	0.315	0.045	0.114	0	0	2	South Sec. Int.
H1	0.043	0.078	0.051	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
H2	0.076	0.078	1.531	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
H3	0.065	0.078	0.162	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
H4	0.074	0.078	0.099	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
H5	0.062	0.078	0.069	0.176	0	0	2	South Sec. Int.

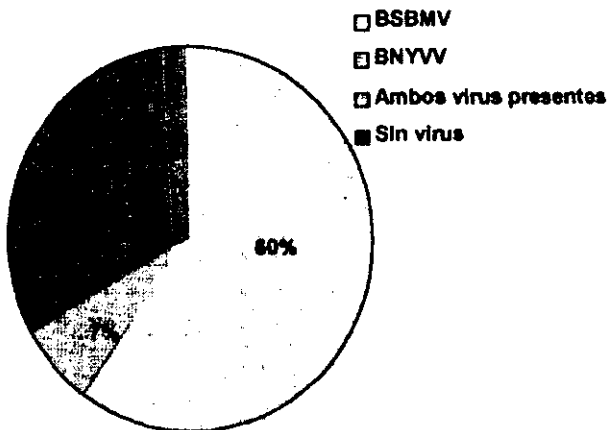
Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
H6	0.071	0.078	0.068	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
H7	0.071	0.078	1.526	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
H8	0.027	0.078	0.042	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
H9	0.021	0.078	0.033	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
H10	0.019	0.078	0.048	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
I1	0.023	0.078	0.042	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
I2	0.027	0.078	0.287	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
I3	0.031	0.078	3	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
I4	0.034	0.078	3	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
I5	0.011	0.078	1.512	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
I6	0.006	0.078	0.036	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
I7	0.065	0.078	0.038	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
I8	0.023	0.078	1.736	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
I9	0.039	0.078	2.008	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
I10	0.018	0.078	0.104	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
J1	0.061	0.078	0.065	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
J2	0.013	0.078	0.007	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
J3	0.015	0.078	0.017	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
J4	0.005	0.078	2.101	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
J5	0.032	0.078	0.042	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
J6	0.049	0.078	0.051	0.176	0	0	2	South Sec. Int.
J7	0.052	0.078	0.525	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
J8	0.039	0.078	1.897	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
J9	0.026	0.078	1.846	0.176	0	1	3	South Sec. Int.
J10	0.058	0.078	0.677	0.176	0	1	3	South Sec. Int.

Tabla 10. Frecuencia del virus BSBMV y del virus BNYVV en el campo de cultivo South Section en el estado de Texas

Tipo de Muestreo:	Total de Muestras	Virus BSBMV positivos	Virus BNYVV positivos	Ambos virus presentes	Ambos virus Ausentes
General	45	27	0	3	15
Porcentaje de Incidencia	-	60	0	6.6	33.33
Intensivo	100	47	0	1	52
Porcentaje de Incidencia	-	47	0	1	52

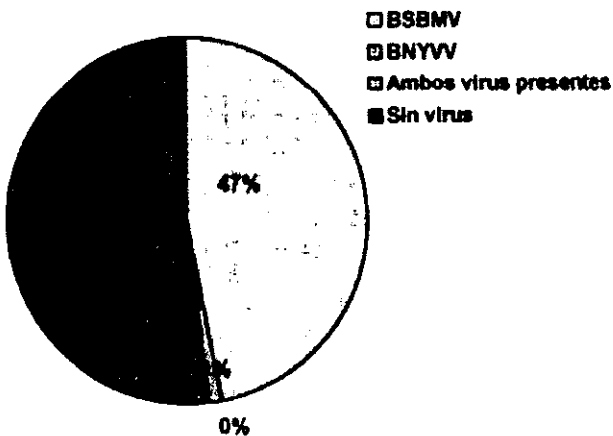
a Indica el tipo de muestreo; b Número total de muestras obtenidas para ese tipo de muestreo; c Datos positivos para los antígenos de BSBMV obtenidos de muestras analizadas por la técnica de ELISA; d Datos positivos para los antígenos de BNYVV obtenidos de muestras analizadas por la técnica de ELISA; e Antígenos del virus BSBMV y del virus BNYVV encontrados en la misma muestra por la técnica ELISA; f Ningún antígeno presente en las muestras analizadas por la técnica de ELISA

Fig.#20 Porcentaje de incidencia de los virus BSBMV y BNYVV para el muestreo general en el campo de cultivo South Section.



8

Fig.# 21 Porcentaje de incidencia de los virus BSBMV y BNYVV para el muestreo intensivo en el campo de cultivo South Section.



Campo de cultivo Scholl

En el campo de cultivo Scholl en la colecta general se obtuvo un total de 80 muestras de suelo en las 32.2 hectáreas del campo de cultivo situado en el estado de Dakota del Norte. El total de las muestras fueron analizadas por la técnica de ELISA, obteniendo los siguientes resultados: los antígenos del virus BNYVV se detectaron en 37 de 80 muestras para dar un porcentaje de incidencia del 50%, mientras que los antígenos del virus BSBMV no se detectaron en ninguna de las muestras; a su vez una muestra positiva se registró para ambos virus, dando el 1.35% de incidencia; 36 muestras resultaron negativas para ambos virus (Tabla 5).

En este campo no se realizó muestreo intensivo.

Tabla #11 Datos de las lecturas de las densidades ópticas obtenidas en los análisis de ELISA del campo de cultivo Scholl régimen general; BN O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpo del virus BNYVV. R.O.D.1 Referencia de las lecturas de densidad óptica que es tres veces el valor de densidad óptica de las muestras control de raíces sanas; BS O.D. Densidad óptica de las placas con anticuerpos del virus BSBMV. BN Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BNYVV. BS Rx. Muestras positivas para los antígenos del virus BSBMV; Infección : 1 ambos virus presentes, 2 ningún virus presente, 3 antígenos del virus BSBMV presentes, 4 antígenos del virus BNYVV presentes.

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
A1	0.064	0.0825	0.08	0.257	0	0	2	Scholl
A2	0.057	0.0825	0.014	0.257	0	0	2	Scholl
A3	0.045	0.0825	0.089	0.257	0	0	2	Scholl
A4	0.117	0.0825	0.062	0.257	1	0	4	Scholl
A5	0.006	0.0825	0.002	0.257	0	0	2	Scholl
A6	0.033	0.0825	0.017	0.257	0	0	2	Scholl
A7	0.037	0.0825	0.006	0.257	0	0	2	Scholl
A8	0.167	0.0825	0.013	0.257	1	0	4	Scholl
A9	0.056	0.0825	0.003	0.257	0	0	2	Scholl
A10	0.034	0.0825	0.033	0.257	0	0	2	Scholl
B1	0.018	0.0825	0.012	0.257	0	0	2	Scholl
B2	0.009	0.0825	0.013	0.257	0	0	2	Scholl
B3	0.024	0.0825	0.003	0.257	0	0	2	Scholl
B4	0.021	0.0825	0.015	0.257	0	0	2	Scholl
B5	0.029	0.0825	0.006	0.257	0	0	2	Scholl
B6					0			Scholl
B7	0.172	0.0825	0.045	0.257	1	0	4	Scholl
B8	0.043	0.0825	0.005	0.257	0	0	2	Scholl
B9	0.029	0.0825	0.004	0.257	0	0	2	Scholl
B10	0.126	0.0825	0.033	0.257	1	0	4	Scholl
C1	0.067	0.0825	0.011	0.257	0	0	2	Scholl
C2	0.71	0.0825	0.051	0.257	1	0	4	Scholl
C3	0.006	0.0825	0.013	0.257	0	0	2	Scholl
C4	0.158	0.0825	0.048	0.257	1	0	4	Scholl
C5	0.204	0.0825	0.044	0.257	1	0	4	Scholl
C6	0.096	0.0825	0.005	0.257	1	0	4	Scholl
C7	0.14	0.0825	0.018	0.257	1	0	4	Scholl
C8	0.014	0.0825	0.024	0.257	0	0	2	Scholl
C9	0.146	0.0825	0.017	0.257	1	0	4	Scholl
C10	0.088	0.0825	0.001	0.257	1	0	4	Scholl
D1	0.196	0.0825	0.036	0.257	1	0	4	Scholl
D2	0.008	0.0825	0.054	0.257	0	0	2	Scholl
D3	0.007	0.0825	0.034	0.257	0	0	2	Scholl
D4	0.386	0.0825	0.062	0.257	1	0	4	Scholl

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
D5	0.189	0.0825	0.061	0.257	1	0	4	Scholl
D6	0.166	0.0825	0.047	0.257	1	0	4	Scholl
D7	0.16	0.0825	0.046	0.257	1	0	4	Scholl
D8	0.011	0.0825	0.073	0.257	0	0	2	Scholl
D9	0.141	0.0825	0.046	0.257	1	0	4	Scholl
D10	0.105	0.0825	0.014	0.257	1	0	4	Scholl
E1	0.014	0.0825	0.051	0.257	0	0	2	Scholl
E2	0.001	0.0825	0.092	0.257	0	0	2	Scholl
E3	0.144	0.0825	0.007	0.257	1	0	4	Scholl
E4	0.039	0.0825	0.062	0.257	0	0	2	Scholl
E5	0.02	0.0825	0.02	0.257	0	0	2	Scholl
E6	0.031	0.0825	0.219	0.257	0	0	2	Scholl
E7	0.163	0.0825	0.112	0.257	1	0	4	Scholl
E8	0.033	0.0825	0.015	0.257	0	0	2	Scholl
E9	0.188	0.0825	0.029	0.257	1	1	1	Scholl
E10	0.555	0.0825	0.093	0.257	1	0	4	Scholl
F1	0.111	0.0825	0.022	0.257	1	0	4	Scholl
F2	0.491	0.0825	0.018	0.257	1	0	4	Scholl
F3	0.268	0.0825	0.077	0.257	1	0	4	Scholl
F4	0.636	0.0825	0.143	0.257	1	0	4	Scholl
F5	0.099	0.0825	0.042	0.257	1	0	4	Scholl
F6					0			Scholl
F7	0.019	0.0825	0.003	0.257	0	0	2	Scholl
F8	0.873	0.0825	0.042	0.257	1	0	4	Scholl
F9	0.518	0.0825	0.114	0.257	1	0	4	Scholl
F10								Scholl
G1								Scholl
G2	0.156	0.0825	0.104	0.257	1	0	4	Scholl
G3	0.177	0.0825	0.055	0.257	1	0	4	Scholl
G4	0.022	0.0825	0.116	0.257	0	0	2	Scholl
G5	0.015	0.0825	0.035	0.257	0	0	2	Scholl
G6	0.012	0.0825	0.069	0.257	0	0	2	Scholl
G7	0.259	0.0825	0.019	0.257	1	0	4	Scholl
G8	0.053	0.0825	0.032	0.257	0	0	2	Scholl
G9					0			Scholl
G10	0.062	0.0825	0.001	0.257	0	0	2	Scholl
H1	0.042	0.0825	0.024	0.257	0	0	2	Scholl
H2	0.035	0.0825	0.151	0.257	0	0	2	Scholl
H3	0.034	0.0825	0.048	0.257	0	0	2	Scholl
H4					0			Scholl
H5	0.082	0.0825	0.057	0.257	1	0	4	Scholl
H6	0.128	0.0825	0.129	0.257	1	0	4	Scholl
H7	1.004	0.0825	0.077	0.257	1	0	4	Scholl
H8	0.109	0.0825	0.074	0.257	1	0	4	Scholl
H9	0.282	0.0825	0.058	0.257	1	0	4	Scholl

Muestra	BN O.D.	R.O.D.	BS O.D.	R.O.D.	BN Rx	BS Rx	Infección	Localidad
H10	0.201	0.0825	0.12	0.257	1	0	4	Scholl

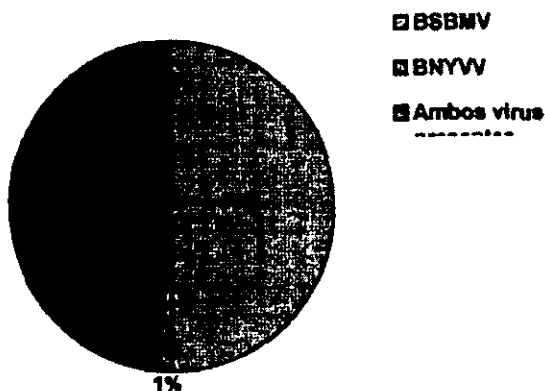
**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA .**

Tabla 12. Porcentaje de incidencia de los virus BSBMV y BNYVV para el campo de cultivo Scholl en el estado de Dakota del Norte.

General	80	0	37	1	36
Porcentaje de Frecuencia	-	0	50	1.35	48.65

a Indica el tipo de muestreo; b Número total de muestras obtenidas para ese tipo de muestreo; c Datos positivos para los antígenos de BSBMV obtenidos de muestras analizadas por la técnica de ELISA; d Datos positivos para los antígenos de BNYVV obtenidos de muestras analizadas por la técnica de ELISA; e Antígenos del virus BSBMV y del virus BNYVV encontrados en la misma muestra por la técnica ELISA; f Ningún antígeno presente en las muestras analizadas por la técnica de ELISA

Fig.#22 Porcentaje de incidencia de los virus BSBMV y BNYVV para el muestreo general en el campo de cultivo Scholl en el estado de Dakota del Norte.



Análisis Estadísticos

A los datos obtenidos en las pruebas de ELISA de las muestras de los cuatro campos de cultivo, se les aplicó un análisis de T-test, para determinar si algunos de los virus era mas prevalente que el otro en el campo. Con este análisis se encontró que no existe ninguna tendencia a la prevalencia de alguno de los dos virus, es decir que ambos virus no presentaron ninguna diferencia significativa a la posibilidad de estar presentes en cualquiera de los campos del estudio (Tablas 13 y 14).

Tabla 13. Prevalencia entre el virus BSBMV y el virus BNYVV para el muestreo general en los cuatro campos de cultivo.

Sitios de Estudio	BNYVV	BSBMV
Bosch	75.64	37.18
Kammerzal	22.03	33.9
South section	6.82	68.18
Scholl	51.35	1.35

Valor de T 0.15 P>|t|)0.8909

Tabla 14 Prevalencia entre el virus BSNMV y el virus BNYVV para el muestreo intensivo en los cuatro campos de cultivo.

Sitios de Estudio	BNYVV	BSBMV
Bosch	34.97	12.59
Kammerzal	27.94	72.06
South section	1.04	50

Valor de T -0.02 P>|t|)0.4135

Dado que los dos virus tienen como vector al mismo hongo y que comparten el mismo hospedero, se puede plantear la existencia de algún tipo de interacción entre ambos virus. Para probar esta hipótesis se aplicó una prueba de χ^2 en la cual se analizó la interacción de ambos virus, la prueba reflejó que no existe ninguna interacción entre los dos virus, es decir que cada uno de los virus es independiente en su presencia en el campo. Además de la prueba de χ^2 , se realizó una prueba estadística de en el programa estadístico SAS.

Tabla 15. Interacción de beet soil mosaic virus (BSBMV) y beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) en las dos condiciones de muestreo en los cuatro sitios de estudio

Sitio de Estudio	Tipo de Muestreo	Número Total de Muestras	Sólo BSBMV presente	Sólo BNYVV presente	Ambos virus presentes en la muestra	Ambos virus ausentes en la muestra	P>X2
a							b
Bosch	General	80	6	37	23	14	0.5614
	Intensivo	156	10	42	8	96	0.367
Kammerzel	Intensivo	70	36	6	13	15	0.6772
	General	59	15	10	5	29	0.7872
South Section	Intensivo	100	47	0	1	52	0.3148
	General	45	27	0	3	15	0.2203
Scholl	General	74	0	37	1	36	0.3271

a. Bosch, Minesota; Kammerzel, Colorado; South section, Texas; Scholl, Dakota del Norte.

b. Prueba de X2 para ver la asociación entre ambos virus en la misma muestra, la asociación resultó no significativa.

La prueba estadística realizada en el programa estadístico SAS para calcular la media de las lecturas de densidades ópticas de las muestras que registraron positivas para los antígenos de BSBMV, BNYVV y para ambos virus presentes en la misma muestra para las placas de ELISA de ambos anticuerpos BSBMV y BNYVV; se realizó con el objetivo de comprobar la hipótesis de que si existía alguna tendencia cuando ambos virus se encuentran presentes en la misma muestra es decir que alguno se encontrara en mayor proporción que el otro en comparación de cuando se encuentran solos y así tratar de observar si se tenía algún tipo de relación; al aplicar el error estándar se observó que sólo algunas muestras como Bosch general con ambos virus para BSBMV, Bosch intensivo para ambos virus BNYVV presentaron valores significativos. Las demás muestras no fueron significantes. (Tablas 16- y Figura #23 y24).

Tabla 16. Bosch Regimen General

Variable	N	Mean	Std Error	Significan
Ambos BNYVV	23	0.2710870	0.0273739	No significant 0.2864947
Ambos BSBMV	23	0.4220000	0.0239531	Significan 0.0239531
Solo BSBMV	6	0.3673333	0.0215045	
Solo BNYVV	37	0.2440278	0.0150930	

Tabla 17. Bosch Regimen Intensivo

Variable	N	Mean	Std Error	Significan
Ambos BNYVV	8	0.9291250	0.1201167	Significan 0.8261112
Ambos BSBMV	8	0.3832500	0.0250020	No significant 0.4127909
Solo BSBMV	10	0.4892000	0.1509701	
Solo BNYVV	42	0.6498333	0.0561612	

Tabla 18. Kammerzal Regimen General

Variable	N	Mean	Std Error	Significan
Ambos BNYVV	5	0.5964000	0.2190221	No significant 0.83104
Ambos BSBMV	5	0.7678000	0.3301847	No Significant 1.40864
Solo BSBMV	15	1.4266250	0.3106617	
Solo BNYVV	10	0.5310000	0.5310000	

Tabla 19. Kammerzal Regimen Intensivo.

Variable	N	Mean	Std Error	Significan
Ambos BNYVV	13	0.4679231	0.0640608	No significan 0.86154
Ambos BSBMV	13	1.0549231	0.0987265	No significan 1.31698
Sólo BSBMV	36	1.1530556	0.0652002	
Sólo BNYVV	6	0.5966667	0.2008166	

Tabla 20. South Section Regimen General

Variable	N	Mean	Std Error	Significan
Ambos BNYVV	3	0.1536667	0.0153007	No significan 1.48128
Ambos BSBMV	3	1.0943333	0.5046498	
Sólo BSBMV	27	0.8509259	0.1257076	
Sólo BNYVV	0	0	0	

Tabla 21. South Section Regimen Intensivo

Variable	N	Mean	Std Error	Significan
Ambos BNYVV	1	0.3610000	.	
Ambos BSBMV	1	2.0290000	.	
Sólo BSBMV	47	1.3120000	0.1201028	
Sólo BNYVV	0	0	0	

Tabla 22. Scholl Regimen General

Variable	N	Mean	Std Error	Significan
Ambos BNYVV	3	0.1536667	0.0153007	No significant 1.48128
Ambos BSBMV	3	1.0943333	0.5046498	
Sólo BSBMV	27	0.8509259	0.1257076	
Sólo BNYVV	0	0	0	

Fig.#23 Valor de las Densidades Ópticas de las lecturas de la Técnica ELISA para las muestreo general

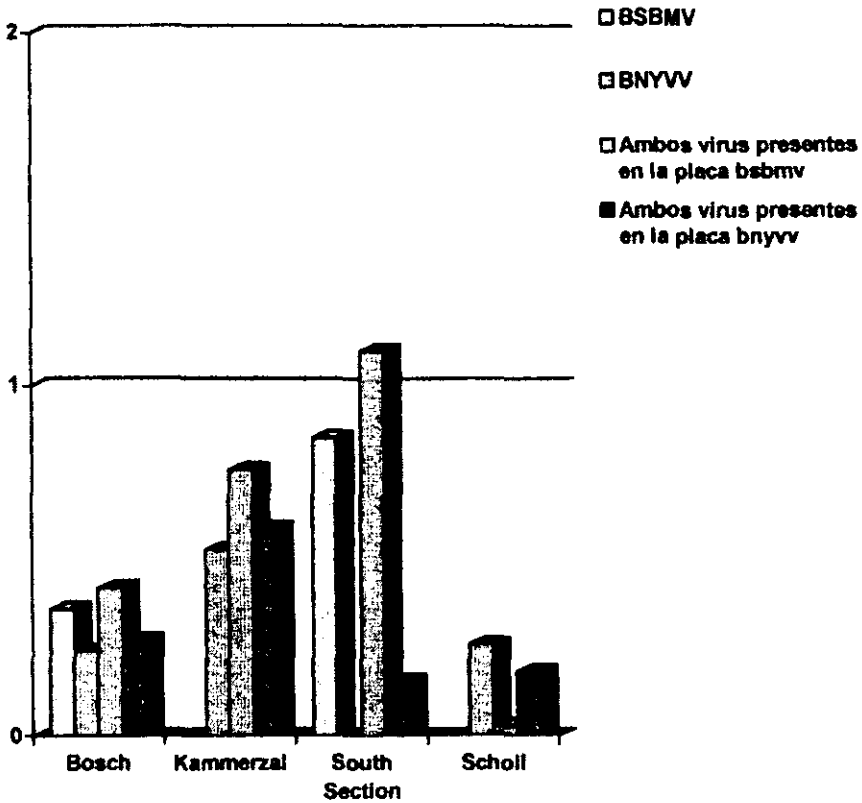
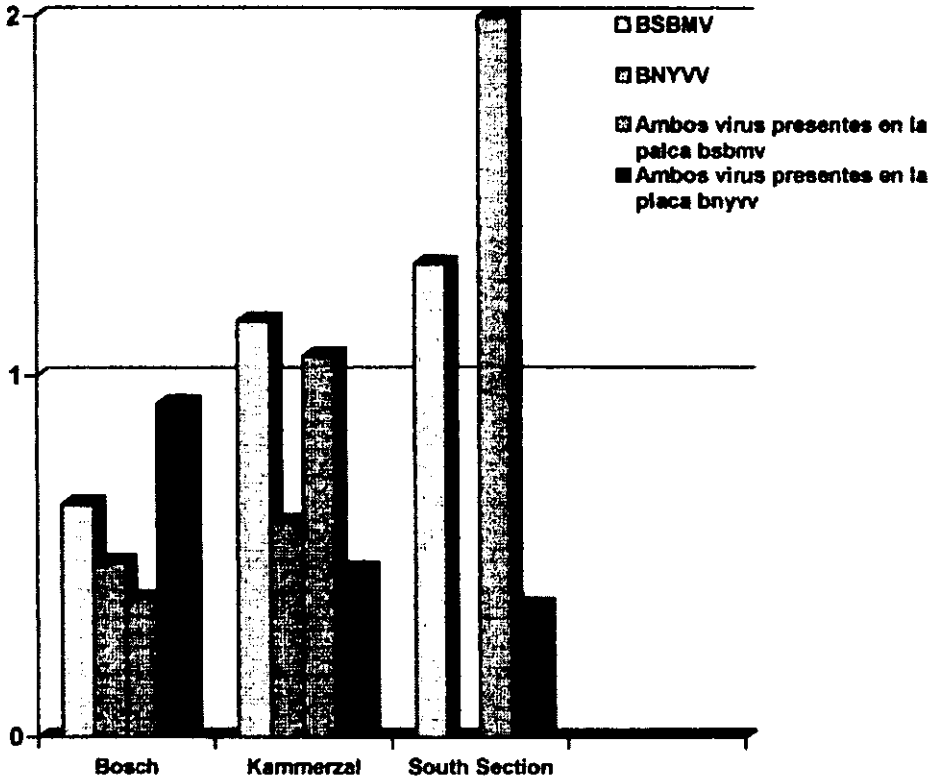


Fig.#24 Valor de las Densidades Ópticas de las lecturas de la Técnica ELISA para las muestras del régimen Intensivo.



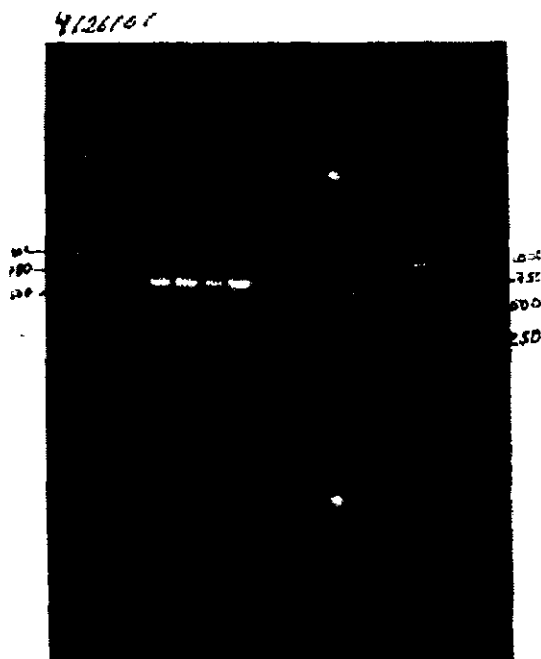
Se realizaron unas pruebas de RT-PCR para corroborar los datos obtenidos por medio de la técnica de ELISA que se realizaron para las muestras de suelo de los cuatro campos de cultivo. Los resultados fueron los siguientes: para las muestras positivas para los antígenos de BSBMV en los análisis de ELISA, B-3 para Bosch,; A-8 para Kammerzal, SS-14 para South Section, resultaron positivas para los *primers* G1972F + G1973R de peso molecular de 618 pb. La secuencia de aminoácidos que copian estos *primers* codifica para la proteína de la capsida. Para las muestras positivas para los antígenos de BNYVV en los análisis de ELISA, C-5 para Bosch; C-4 para Kammerzal y A-4 para Scholl, resultaron negativas para los mismos *primers*. Estos resultados ratificaron la efectividad de los datos obtenidos por medio de la técnica de ELISA, por medio de la cual se analizaron el total de las muestras colectadas.

Tabla #23 Resultados de la prueba de PCR para corroborar las muestras de suelo analizadas que presentaron los antígenos del virus BSBMV y BNYVV con la Técnica de ELISA

Localidad	Muestra positiva para BSBMV en los análisis de ELISA	Muestra positiva para BNYVV en los análisis de ELISA	RT-PCR resultados Positivos	RT-PCR resultados Negativos	Peso Molecular
Bosh	B-3	G-5	B-3 +	G-5 -	618 pb.
Kammerzal	A-8	C-4	A-8 +	C-4 -	618 pb.
South Section	SS-14	*	SS-14+		618 pb.
Sholl	*	A-4		A-4 -	618 pb.

* Ninguna muestra positiva para los antígenos; *primers* G1972F+G1973R, peso molecular de 618 pb.

Fig #25 Fotografía del Gel de la técnica de RT-PCR



1 Marcador Molecular de 1Kb.

2 Vacio

3 C' *Quinoa* inoculado con virus BSBMV

4 Muestra H-3

5 Muestra A-8

6 Muestra SS-14

7 Virus BSBMV purificado

8 Muestra G-5

9 Muestra C-4

10 Muestra A-4

11 Virus BNYVV purificado

12 C' *Quinoa* Inoculado con BNYVV

13 Vacio

14 Marcador Molecular 1Kb

Discusión

Este trabajo se realizó en cuatro campos de muestreo ubicados en cuatro estados, estos estados fueron escogidos por representar a dos áreas importantes para la producción de remolacha, Minesota y Dakota de Norte que representa la mayor área de producción de remolacha en el alto medio oeste de los Estados Unidos y los estados de Colorado y Texas que pertenecen a la región de las grandes planicies, la cual es la región geográfica más extensa del país, además de que para cada uno de los campos se contó con la participación de los agricultores al permitirnos estudiar a estos patógenos para el mayor conocimiento a cerca de la enfermedad, la cual es tan devastadora para la industria azucarera; el campo de cultivo de Texas aunque es un campo experimental, representa las condiciones ambientales presentes en este estado, además de que en el se ha estado estudiando el comportamiento de BNYVV y BSBMV en los últimos diez años.

La ausencia de trabajos acerca de la distribución de este tipo de patógenos es muy limitada de hecho este trabajo es uno de los primeros en la investigación de la distribución de estos virus en el campo, por lo tanto no habiendo materia disponible para observar un método de colecta apropiado ya que en la literatura anteriormente se mencionan que en muestreos realizados para la distribución de virus fueron tomadas muestras al azar (Heidel y Rush, 1994) el tipo de muestreo utilizado en este estudio fue considerado como un método general ya que es la manera en que los campesinos toman las muestras en las largas extensiones de estos terrenos para analizarlas y en el estudio se quiso investigar que tan efectivo era este tipo de muestreo, además se consideró un

muestreo intensivo para poder comparar los resultados de distribución en ambos tipos de muestreos.

En los resultados de distribución se encontró que aunque ambos virus fueron identificados en los cuatro sitios de estudio, su distribución varía dependiendo de campo de cultivo en que se encuentren, se puede encontrar una distribución completa, dispersados por todo el campo de cultivo como en el caso de Bosch (Mapa1) en el cual el virus predominante es el BNYVV o una distribución al azar en grupos como en el caso de Kammerzal (Mapa 3) y esta clase de distribución presenta la misma tendencia para ambos tipos de muestreo no existió ningún patrón, como se puede observar en el mapa 2 Bosch intensivo presenta una distribución mas de pequeños grupos en comparación con el muestreo intensivo de Kammerzal (Mapa 4) donde su distribución se muestra mas general a través de toda el área muestreada. Este tipo de distribución pudo haberse encontrado por diversas razones: una pudiera ser el tipo de muestreo realizado, el cual por ser tan amplio no nos indique la verdadera cantidad de patógeno presente en los campos, o que el número tan pequeño de campos muestreados no representa en realidad una muestra adecuada para percibir una tendencia de distribución del virus. Otra razón podría ser el tiempo en que el virus haya entrado en ese campo, si el virus ha estado presente durante mucho tiempo es muy probable que su distribución sea mayor que si, por el contrario, este ha sido introducido mas recientemente. Por otro lado en el caso que la introducción del virus no haya sido reciente, la dispersión del virus en el campo no sería solamente ocasionada por el movimiento natural del patógeno en el suelo, sino por el manejo agronómico del terreno, es decir, el barbecho constante para la utilización de

las tierras en diversos cultivos por medio de la maquinaria de trabajo puede dispersar con mayor rapidez al patógeno. Otra razón podría ser la diferencia del tipo de suelo en cada uno de los campos, si este suelo conserva más las partículas de agua, facilita el movimiento natural del patógeno. Otra razón a considerar podría ser el medio ambiente, tal vez las diferencias de distribución del virus sean tendencia a las condiciones medios ambientales que favorezcan el desarrollo de uno de los virus en contraste con el otro, la diferencia de temperaturas en el suelo durante el tiempo de siembra podría ser un factor importante (Ciafardini y Martota, 1989), además la consideración del uso del terreno anteriormente, es decir la historia de cultivos en el terreno, ya que como el cisticercario, estadio de latencia del vector transmisor del virus *P. betae* puede vivir por muchos años en el suelo (Abe y Tamada, 1986). Por otro lado la consideración de diferentes cepas con diferente capacidad de competencia que pueden dirigir la tendencia a que un virus esté más presente que otro dentro del campo, y esto afectar su distribución (Heidel, Rusch, Kendall y French, 1997). Otra razón podría ser la capacidad de este tipo de virus para presentar variabilidad en su genoma que pudiera resultar en diferencia de expresión de los síntomas o reacciones serológicas, que pudieran afectar las lecturas de los resultados de infección y no reflejar una presencia real del patógeno, en los sitios muestreados (Rush, French y Heidel, 1994). Otra explicación podría ser la asociación que estos dos virus pudieran tener en el campo. Al ser transmitidos ambos por el mismo vector podría esperarse la presencia de algún tipo de relación mutua o de control natural entre ambos virus, es decir que uno mantuviera la supresión del otro, dependiendo de las condiciones ambientales favorables para alguno de ellos, esto también podría afectar la distribución

debido a que aunque estuvieran presentes ambos virus en el campo uno no permitiría la expresión del otro (Mahmood y Rush, 1999), aunque los datos estadísticos realizados para esta hipótesis no reflejaron ningún tipo de asociación entre estos virus, podría deberse a que los datos analizados representan una muestra muy pequeña para considerarse estadísticamente, para obtener resultados más confiables se deben realizar muestreos más intensivos a un número mayor de campos.

Conclusión.

Se realizaron unas pruebas de RT-PCR para corroborar los datos obtenidos por medio de la técnica de ELISA que se realizaron para las muestras de suelo de los cuatro campos de cultivo. Con los siguientes resultados, para las muestras positivas para los antígenos de BSBMV en los análisis de ELISA, B-3 para Bosch,; A-8 para Karmmezal, SS-14 para South Section, resultaron positivas para los *primers* G1972F + G1973R de peso molecular de 618 pb. Para las muestras positivas para los antígenos de BNYVV en los análisis de ELISA, C-5 para Bosch; C-4 para Kammerzal y A-4 para Scholl, resultaron negativas para los mismos *primers*. Estos resultados ratificaron la efectividad de los datos obtenidos por medio de la técnica de ELISA, por medio de la cual se analizaron el total de las muestras colectadas.

El campo de cultivo Bosch para en la colecta general se obtuvo un total de 80 muestras de suelo en las 32.2 hectáreas del campo de cultivo situado en el estado de Minesota. El total de las muestras fueron analizadas por medio de la prueba serológica ELISA, obteniendo los siguientes resultados: los antígenos del virus BNYVV se detectaron en 37 de 80 muestras para dar un porcentaje de incidencia del 46.75%, mientras que los antígenos del virus BSBMV se detectaron en seis muestras con un porcentaje de incidencia del 7.1%; a su vez 23 muestras positivas se registraron para ambos virus, el 26.92% de incidencia; 14 muestras resultaron negativas para ambos virus con una incidencia del 17.5% (Tabla 2 y figura #16). Para el muestreo intensivo donde se analizaron 156 muestras de suelo colectadas en 404 m², se encontró que 26.92% es

decir 42 de las 156 muestras fueron positivas para el virus BNYVV, 10 positivas para BSBMV un 6.41%, ocho se registraron con ambos virus presentes un 5.12% de incidencia de incidencia y en 96 muestras se encontró la ausencia de ambos virus BNYVV y BSBMV con el es decir el 61.53% (tabla 2 y figura #17).

En el campo de cultivo llamado Kammerzal localizado en el estado de Colorado, en el muestreo general se obtuvo un total de 59 muestras en las 26.66 hectáreas del campo de cultivo; 15 muestras reaccionaron positivo para los antígenos del virus BSBMV, dando un 25.42% de incidencia; en 10 de las muestras se registraron los antígenos del virus BNYVV, con un 16.94% de incidencia; cinco muestras reaccionaron positivas para ambos virus dando un 8.47% de incidencia y en 29 muestras no se registró ninguno de los antígenos ni para el virus BSBMV ni para el virus BYNVV (Tabla 7 y Figura #18). En el muestreo intensivo se obtuvo un total de 70 muestras de las cuales 36 reaccionaron positivas para los antígenos de BSBMV, dando un 51.42% de incidencia; seis muestras se registraron positivas para los antígenos de BNYVV, con un 8.57% de incidencia; 13 registraron positivas para ambos virus, con un 18.57% de incidencia y 15 muestras no reportaron presencia de ninguno de los dos virus (Tabla 7 y Figura #19).

En el campo de cultivo denominado South Section localizado en el estado de Texas se analizaron un total de 45 muestras en una extensión de 18.18 hectáreas. En el muestreo general, 27 muestras resultaron positivas para los antígenos del virus BSBMV, con un 60% de incidencia; no se encontraron muestras positivas para los antígenos del virus BNYVV, tres muestras se presentaron positivas para ambos virus, dando un 6.6%

de incidencia; 15 reaccionaron negativas para ambos virus. (Tabla 10 y Figura #20) Para el muestreo intensivo, de las 100 muestras colectadas en los 404 m² se encontró 47 muestras positivas para los antígenos del virus BSBMV, con un 47% de incidencia; no se registró ninguna muestra positiva para los antígenos del virus BNYVV; y sólo una muestra fue encontrada positiva para ambos virus, con un 1% de incidencia; 52 muestras no registraron presencia de ninguno de los dos virus (Tabla 10 y Figura #21)

En el campo de cultivo Scholl en la colecta general se obtuvo un total de 80 muestras de suelo en las 32.2 hectáreas del campo de cultivo situado en el estado de Dakota del Norte. El total de las muestras fueron analizadas por la técnica de ELISA, obteniendo los siguientes resultados: Los antígenos del virus BNYVV se detectaron en 37 de 80 muestras para dar un porcentaje de incidencia del 50%, mientras que los antígenos del virus BSBMV no se detectaron en ninguna de las muestras; a su vez una muestra positiva se registró para ambos virus, dando el 1.35% de incidencia; 36 muestras resultaron negativas para ambos virus (Tabla 5). No se realizó muestreo intensivo para este campo debido a que al regresar e realizar el muestreo ya se había sacado toda la cosecha de remolacha.

A los datos obtenidos en las pruebas de ELISA de las muestras de los cuatro campos de cultivo, se les aplicó un análisis de T-test, para determinar si algunos de los virus era mas prevalente que el otro en el campo y se encontró que no existe ninguna tendencia a la prevalencia de alguno de los dos virus (Tablas 13 y 14). Como los dos virus tienen como vector al mismo hongo y que comparten el mismo hospedero, se planteó la posible

existencia de algún tipo de interacción entre ambos virus. Para probar esta hipótesis se aplicó una prueba de χ^2 en la cual se analizó la interacción de ambos virus, la prueba reflejó que cada uno de los virus son independientes en su presencia en el campo. Además de la prueba de χ^2 se realizó una prueba estadística de en el programa estadístico SAS para calcular la media de las lecturas de densidades ópticas de las muestras que registraron positivas para los antígenos de BSBMV, BNYVV y para ambos virus presentes en la misma muestra, con el objetivo de comprobar la hipótesis de la posible tendencia a que alguno de los virus se encontrara en mayor proporción que el otro en comparación de cuando se encuentran sólo; al aplicar el error estándar se observó que sólo algunas muestras como Boch general con ambos virus para BSBMV, Bosch intensivo para ambos virus BNYVV presentaron valores significativos. Las demás muestras no fueron significantes. (Tablas 16- y Figura #23 y24).

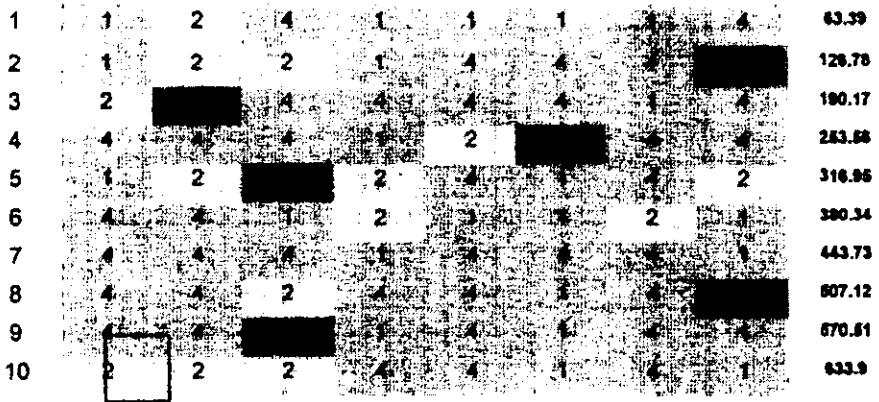
En los resultados de distribución se encontró que aunque ambos virus fueron identificados en los cuatro sitios de estudio, su distribución varía dependiendo del campo de cultivo en que se encuentren, se puede encontrar una distribución completa, dispersados por todo el campo de cultivo como en el caso de Bosch (Mapa1) en el cual el virus predominante es el BNYVV o una distribución al azar en grupos como en el caso de Kammerzal (Mapa 3) y esta clase de distribución presenta la misma tendencia para ambos tipos de muestreo no existió ningún patrón. Estos resultados pueden deberse a distintos factores: el tiempo que el virus ha estado presente en el campo de cultivo, las prácticas agrícolas que se efectúen y el tipo de cepa del virus que esté presente.

Perspectivas

Este trabajo continuará con la realización de la maestría. Un segundo muestreo será efectuado en el cual se considerará un método mas eficaz para poder muestrear las áreas de trabajo que reflejen con mayor detalle la presencia de estos patógenos, que a la vez sea eficiente y económicamente manejable, además de utilizar otros métodos conjuntos para la detección de la distribución de este tipo de virus como el llamado imágenes de sensibilidad por vía remota (Remote Sensitive Image) que actualmente se está llevando a cabo en una investigación dentro del TAES combinando los datos obtenidos dentro de este trabajo, con imágenes de fotografías tomadas con cámara infraroja desde el aire para comparar los sitios de decoloraciones en los campos que detecten síntomas del virus y los resultados de las pruebas de ELISA, también se deberá de analizar un número mayor de sitios muestreados para tener una mejor representatividad de muestra estadística y ver si existe realmente una tendencia no mostrada en este trabajo por el número pequeño de sitios muestreados además, las muestras tomadas para analizar la distribución servirán para investigar la posibilidad de la variabilidad de virus entre los diferentes estados, los diferentes campos de cultivo y entre los virus del mismo campo de cultivo, a través de PCR, SSCP, que permiten el estudio de variabilidad en regiones específicas del genoma.

Mapa # 1

Bosch Muestreo General



63.39 126.78 190.17 253.56 316.95 380.34 443.73 507.12 Mts.



- 1 BNYVV y BSBMV presentes en la misma muestra
- 2 Ningún virus presente en la muestra
- 4 Sólo BSBMV presente
- 4 Sólo BNYVV presente
- Muestreo Intensivo

Mapa #2

Bosch Muestreo Intensivo

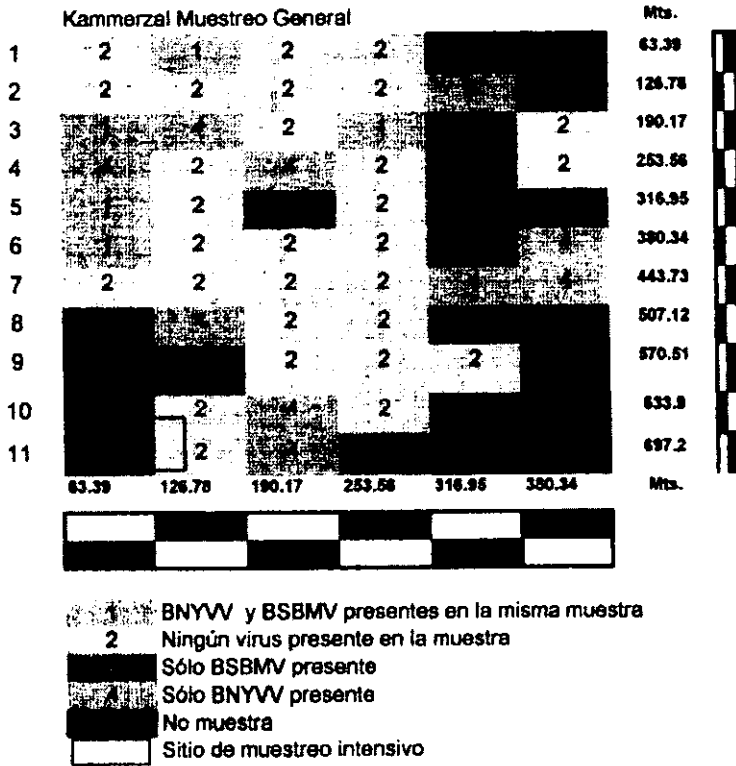
Mts.

1	2	2	1	2	2	2	7.82
2	2	2	2	2	2	2	16.34
3	2	2	2	2	2	2	22.86
4	2	2	2	2	2	2	30.48
5	2	2	2	2	2	2	38.1
6	2	2	2	2	2	2	45.72
7	2	2	2	2	2	2	53.34
8	2	2	2	2	2	2	60.96
9	2	2	2	2	2	2	68.58
10	2	2	2	2	2	2	76.2
11	2	2	2	2	2	2	83.82
12	2	2	2	2	2	2	91.44
13	2	2	2	2	2	2	99.06
14	2	2	2	2	2	2	106.68
15	2	2	2	2	2	3	114.3
16	2	2	2	2	2	2	121.9
17	2	2	2	2	2	2	129.5
18	2	2	2	2	2	2	137.1
19	2	2	2	2	2	2	144.7
20	2	2	2	2	2	2	152.3
21	2	2	2	2	2	2	160
22	2	2	2	2	2	2	167.6
23	2	2	2	2	2	2	175.2
24	2	2	2	2	2	3	182.8
25	2	2	2	2	2	2	190.4
26	2	2	2	2	2	2	198
0	4.572	9.144	13.716	18.288	22.86	27.43	Mts.

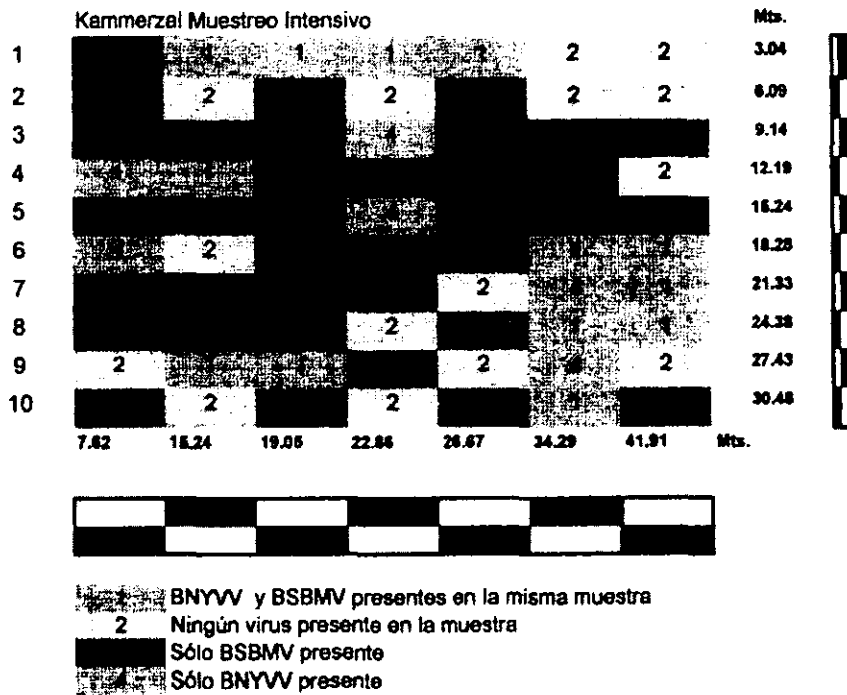


- 1 BNYVV y BSBMV presentes en la misma muestra
- 2 Ningún virus presente en la muestra
- 3 Sólo BSBMV presente
- 4 Sólo BNYVV presente

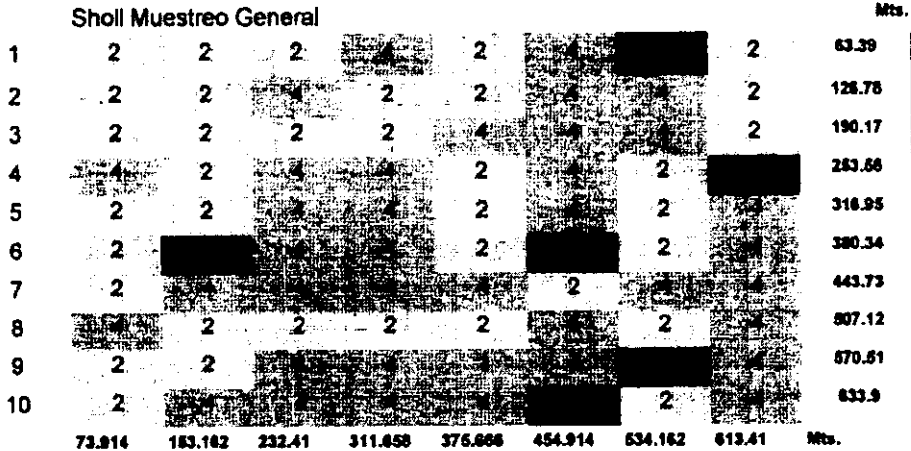
Mapa # 3



Mapa # 4



Mapa #5

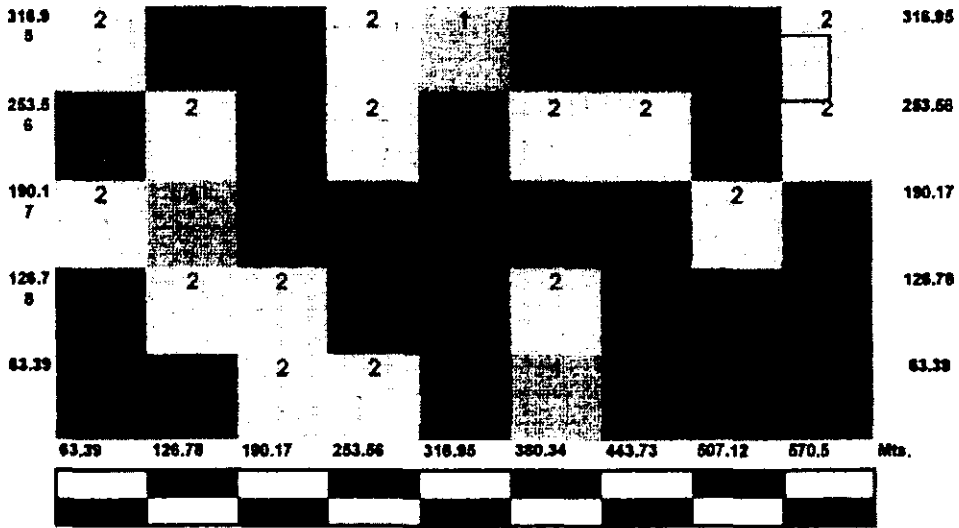


- BNYVV y BSBMV presentes en la misma muestra
- Ningún virus presente en la muestra
- Sólo BSBMV presente
- Sólo BNYVV presente
- No muestra

Mapa # 6

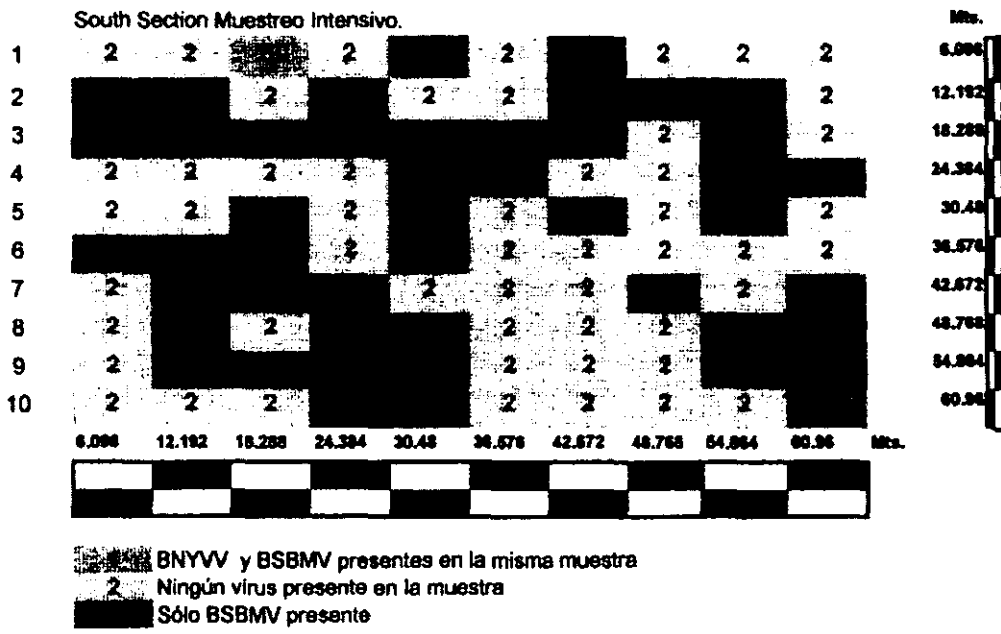
Mts. South Sesion Muestreo General

Mts.



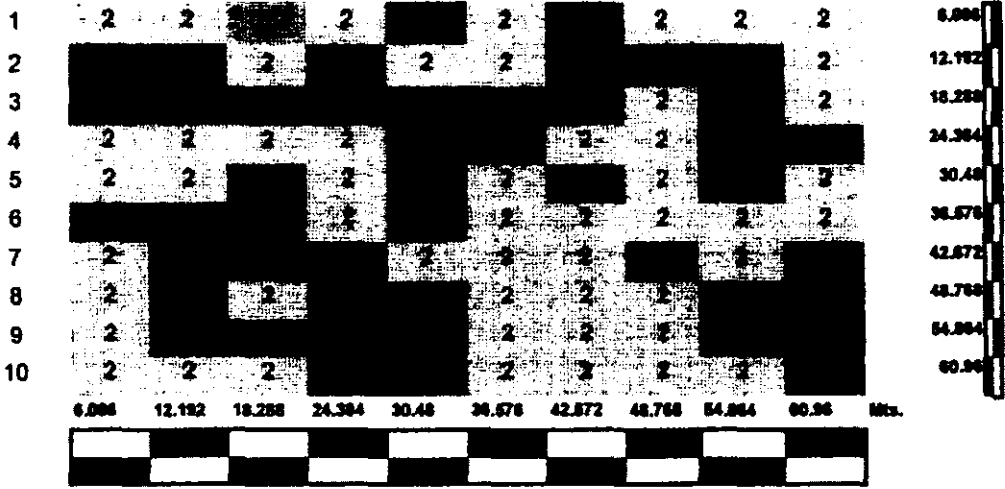
- 1 BNYVV y BSBMV presentes en la misma muestra
- 2 Ningún virus presente en la muestra
- Sólo BSBMV presente
- Sólo BNYVV presente
- Muestreo intensivo.




Mapa #7



Mapa #7

South Section Muestreo Intensivo.



-  BNYV y BSBMV presentes en la misma muestra
-  Ningún virus presente en la muestra
-  Sólo BSBMV presente

Bibliografía

1. Abe, H., y Tamada, T. 1986. Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. *Ann Phytopathol Soc. Jpn.* 52:235-247.
2. Abe, H., y Ui, T. 1986. Host range of *Polymyxa betae* Keskin strains in rhizomania-infested soil of sugar beet fields in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 52:394-403
3. Ascher, M., y Thompson, K. 1987. Rhizomania in Europe. *Br. Sugar Beet Rev.* 55:24-28
4. Barr, D.J.S. 1988. Zoosporic plant parasites as fungal vectors of virus: Taxonomy y life cycles of species involved. Pag. 123-137 in *Development in Applied Biology 2, Viruses with Fungal Vectors*, J. I. Cooper y M. J. C Ascher, eds. University of St. Andrews, U.K.
5. Barr, K.J., y Asher, M.J.C. 1992. The host range of *Polymyxa betae* in Britain. *Plant Pathol.* 41:64-68.
6. Blunk, S.J., Asher, M.J.C. y Gilligan, C.A. 1991. Infection of sugar beet by *Polymyxa betae* in relation to soil temperature. *Plant Pathology.* 40:257-267.
7. Bouzoubaa, S., Guilley, H., Jonard, G., Jupin, I., Quillet, L., Richards, K., Scheidecker, D., y Ziegler-Graff, V. 1988. Genome organization and function of beet necrotic yellow vein virus. *Develop. Appl. Biol.* 2:99-110.
8. Bouzoubaa S., Quillet, L., Guilley H., Richards, K., 1987. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-1. *J. Gen. Virol.* 68:615-626.
9. Bouzoubaa S., Ziegler, V., Beck, D., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. 1986. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-2. *J. Gen. Virol.* 67:1689-1700
10. Bouzoubaa S., Guilley, H., Jonard G., Richards, K., y Putz, C. 1985. Nucleotide sequence analysis of RNA-3 and RNA-4 of beet necrotic yellow vein virus, isolates F2 and G1. *J. Gen. Viron.* 68:615-626.
11. Brunt, A. A., y Richards, K. E. 1989. Biology and molecular biology of furoviruses *Adv. Virus Res.* 36:1-32.

12. Brunt, A.A., y Shikata, E. 1986. Fungus Transmitted and similar labile rod-shape viruses. Pag. 305-335 in: *Plant Viruses Vol. 2, The Rod-Shape Plant Viruses* M.H. V. Van Regenmortel and Heinz Fraenkel-Conrat, eds. Plenum Publishing, New York
13. Ciafardini, G. y Marotta B. 1989. Use of the Most-Probable-Number Technique to Detect *Polymyxa betae* (*Plasmodiophoromycetes*) in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. May 1989 pp 1273-1278.
14. Duffus, J. E., y Liu, H. Y. 1987. First report of rhyzomania of sugar beet from Texas. *Plant Dis.* 71:557.
15. Duffus, J. E., Whitney, E. D., Larsen, R. C., Lui, H. Y., and Lewellen, R. T. 1984. First report in Western hemisphere of rhyzomania of sugar beet caused by beet necrotic yellow vein virus. *Plant Dis.* 68:251
16. Fauquet, C., Desbos, D., Fargette, D., and Vidal, G. 1988. Classification of furoviruses based upon the amino acid composition of their coat protein. Pag. 19-36 in: *Development in Applied Biology 2, Viruses with Fungal Vectors*, J.I. Cooper and M.J.C. Asher, eds. University of St. Andrews, U.K.
17. Fujisawa, I. y Sugimoto T. 1976. Transmission of beet necrotic yellow vein virus by *polymyxa betae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 43:583-586.
18. Gerik, J. S. 1994. Rhyzomania- An update *Sugar Beet Update* 4:10-12
19. Gerik, J.S., y Duffus, J.E. 1987. Host range of California isolates of *Polymyxa betae*. *Phytopatology* 77:1759.
20. Gerik, J.S., y Duffus, J.E. 1989. Spatial occurrence of *Polymyxa betae* and beet necrotic yellow vein virus in California sugar beet fields. *J. Sugar Beet Res.* 26:A8
21. Gerik, J. S., Templete, S. R. 1991. Comparison of direct seeding and seedling transplanting on yield loss in sugar beet fields. *J. Sugar Beet Res.* 28:71
22. Harveson, R.M., y Rush, C. M. 1993. An environmentally controlled experiment to monitor the effect of *aphanomyces* root rot and rhyzomania on sugar beet. *Phytopathology* 83:1220-1223.
23. Harveson, R.M., y Rush, C. M. 1993. Movement of viruliferous *Polymyxa betae* from a point source inoculation. *J. Sugar Beet Res.* 30:97

24. Harveson, R.M., y Rush, C. M. 1994. Evaluation of fumigation and rhizomania-tolerant cultivars for control of root disease complex of sugar beets. *Plant Dis.* 78:1197-1202.
25. Heidel, G. B., y Rush C. M. 1994. Distribution of beet necrotic yellow vein virus, beet distortion mosaic virus, and an unnamed soil-borne sugar beet virus in Texas and New Mexico. *Plant dis.* 78:603-606.
26. Heidel, G. B., y Rush C.M.. Effects on growth of two sugar beet cultivars infected by BNYVV,BSBMV, or BNYVV+BSBMV. *J. Sugar Beet Res.* In press
27. Heidel,G. B., Rush C. M., Kendall, T. L., y Lommel, S.A.1993. Partial characterization of a soilborne sugar beet virus in Texas, *J. Sugar Beet Res.* 30:98
28. Heidel, G. B., Rush C. M., Kendall, T.L., Lommel, S.A., y French, R.C. 1997. Characteristics of Beet Soilborne Mosaic Virus, a Furo-like Virus Infecting Sugar Beet. *Plant. Dis.* 81:9: 1070-1076.
29. Hutchison, P. J., Henry, C.M., y Coutts, R.H. A. 1992. A comparison, using dsRNA analysis, between beet soil-borne virus and some other tubular virus isolated from sugar beet. *J. Gen. Virol.* 73:1317-1320.
30. Ivanovic, M., y Macfarlane, I. 1982. A tubular virus associated with infection of sugar beet by *polymyxa betae*, Rep. Rothamsted Exp. Stn. 1981, pp 190-191.
31. Jupin I., Tamada, T., y Richards, K. 1991. Patogénesis of beet necrotic yellow vein virus. *Virology* 2:121-129
32. Kaufmann, A., Koenig, R., y Lesemann, D. E. 1992. Tissue print-immunoblotting reveals an uneven distribution of beet necrotic yellow vein virus and beet soil-borne virus in sugar beet. *Arch. Virol.* 126:329-335
33. Kaufmman, A., Koenig, R. y Rohloff, H. 1993. Influence of beet soil-borne virus on mechanicall inoculated sugarbeet. *Plant pathol.* 42:413-417.
34. Koenig, R., y Burgermeister, W. 1998. Mechanical Inoculation of sugarbeet roots with isolates of beet necrotic yellow vein virus having different RNA compositions. *J. Phytopathol.*124:249-255.
35. Landell Mills Commodities Studies. 1994. The importance of Sugar and Corn Sweetener Industry to the U.S. Economy. Landell Mills Commodities Studies, New York.

36. Lindsten, K., y Rush, C.M. 1994. First report of beet soilborne virus in Unated State. *Plant Dis.* 78:316
37. Liu, H-Y., y Duffus, J.E. 1998 The occurrence of a complex of viruses associated with rhizomania of sugar beet. (Abstr.) *Phytopathology* 78:1583.
38. Mahmood, T., y Rush C.M. 1999. Evidence of Cross-Protection Between Beet Soilborne Mosaic Virus and Beet Necrotic Yellow Vein Virus in Sugar Beet. *Plant Dis.* 83:6:521-526
39. Richards, K., y Tamada, T. 1992. Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:291-313
40. Rush C. M., French, R.C., y Heidel, G. B. 1993. Texas 7 a possible strain of beet necrotic yellow vein virus. Pag. 59-62 in: Proc. Symp. Int. Work. Group Plant Viruses Fungal Vectors, 2nd. Montreal, Canada.
41. Rush, C.M., French. R.C., y Heidel, G. B. 1994. Differentiation of two closely related furoviruses using the polymerase chain reaction. *Phytopathology.* 84:1366-1369.
42. Rush, C.M. y Heidel, G. B. Variation in symptomatology and serotype among furoviruses infecting sugar beets. *J. Sugar Beet Res.* In press.
43. Rush, C.M. y heidel, G. B. 1995. Furovirus Diseases of Sugar Beets in the United States. *Plant Dis.* 79:9
44. Sugar and Sweetens Yearbook, 2000. Economical Research Service, U.S. Department of Agricultural Washington, D.C. 20036-5831
45. Sugar and Sweetens Yearbook, production by commodities, 2000. Economical Research Service, U.S. Department of Agricultural Washington, D.C. 20036-5831
46. Stakes, M.E., Davis, C.S., Koch, G.G. 1995. Categorical Data Anlysis Using the SAS System. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA. Chapter 7.
47. Tamada T. 1973. Beet necrotic Yellow Vein Virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of *Plant Viruses* 144.
48. Tamada, T., Saito, M., Kiguchi, T., y Kusume, T. 1990. Effects of isolates of beet necrotic yellow vein virus are needed for infection. *J. Gen. Virol.* 65:119-127.

49. Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T., y Harada, T. 1989. Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *J. Gen. Virol.* 70:3399-3409.
50. Tamada T. 1999. Benyviruses. Enciclopedia of Virology. Edi. R.G. Webster and A. Granoff. Second Edition. Academic Press. London. Pp 154-160.
51. Tuijter, G. C., 1993. Horizontal spread of beet necrotic yellow vein virus in soil. *Neth. J. Plant Pathol.* 99:85-96.
52. Van Regenmortel, M.H.V. 1982. Serology and Immunochemistry of Plant Viruses. edi. Academic Press. New York.
53. Wisler, G.C., Duffus, J.E., y Liu, H.-Y. 1993. Variations among furoviruses associated with sugar beet. Pag. 63-66 in: Proc. Symp. Int. Work. Group Plant Viruses Fungal Vectors, 2nd. Montreal, Canada.
54. Wisler, G.C., Liu, H.-Y., y Duffus, J.E. 1994. Beet necrotic yellow vein virus and its relationship to eight sugar furo-like viruses from the United States. *Plant Dis.* 78:995-1001.
55. Wisler, G.C., Lewellen, R.T., Sears, J.L., Liu H.-Y., Duffus, J.E. 1999. Specificity of TAS- ELISA for Beet Necrotic Yellow Vein Virus and Its Application for Determining Rhizomania Resistance in Field-Grown Sugar Beet. *Plant Dis.* 83:9