

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



Presencia del TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*:  
Geminiviridae) en plantaciones de tomate (*Lycopersicon  
esculentum* L.) en Salamá, Sanarate y Asunción Mita.

Trabajo de investigación presentado por Estuardo Solares Reyes  
para optar el grado de Licenciado en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala  
2007

Presencia del TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*:  
Geminiviridae) en plantaciones de tomate (*Lycopersicon  
esculentum* L.) en Salamá, Sanarate y Asunción Mita.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

Presencia del TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*:  
Geminiviridae) en plantaciones de tomate (*Lycopersicon  
esculentum* L.) en Salamá, Sanarate y Asunción Mita.

Trabajo de investigación presentado por Estuardo Solares Reyes  
para optar el grado de Licenciado en Bioquímica y  
Microbiología

**BIBLIOTECA**  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Guatemala,  
2007




## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de graduación es resultado del seguimiento de los begomovirus en plantaciones de Guatemala por parte del Departamento de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. La investigación de la presencia del virus se inició como punto de Tesis en marzo del 2007 con la detección del virus TYLCV por el Dr. Gilberston de la Universidad de Davis en California, EEUU. Este proyecto se desarrolló con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYT, la Universidad de Davis en California EEUU y la Universidad Hebrea en Jerusalén, Israel. .

Fueron muchas las personas que contribuyeron con el éxito de este proyecto; algunas de ellas continuaron trabajando en esta área a pesar de los cambios políticos y laborales; otras, se dedicaron a otras actividades. Quiero agradecer especialmente a la Licenciada Margarita Palmieri, cuyo apoyo y dirección incondicionales fueron indispensables para el desarrollo del proyecto y la culminación de este trabajo de graduación. También quiero agradecer a Wilfredo López, Lucia Ortiz, Elena Dardon y Andrés Avalos, quienes trabajaron en el proyecto y claro mis compañeros de laboratorio Marco García, Wendy Argueta, Mishel Stephenson, Luís Martínez y Freddy Mejía.

Finalmente, pero no menos importante, quiero extender un agradecimiento muy especial a mi padre, Rolando Solares García, mi madre, Maria del Carmen Reyes de Solares, y mis hermanos, Rolando y Carmen Maria por haberme apoyado durante todo el tiempo que me tomó completar este trabajo. Agradezco a Dios, a toda mi familia y amigos, por haber estado a mi lado durante este paso tan importante en mi vida y carrera profesional.

Vo.Bo. :

(i)   
\_\_\_\_\_  
Licda. Elena Dardon

(i)   
\_\_\_\_\_  
Licda. Margarita Palmieri

Tribunal Examinador

(i)   
\_\_\_\_\_  
Licda. Elena Dardon

(i)   
\_\_\_\_\_  
Licda. Margarita Palmieri

(i)   
\_\_\_\_\_  
Dra. Pamela Pennington

## CONTENIDO

LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE GRÁFICOS .....	x
RESUMEN.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes.....	3
1. Begomovirus.....	3
2. TYLCV.....	6
a. Generalidades.....	6
b. Transmisión.....	7
c. Sintomatología.....	8
3. Vector.....	9
a. Generalidades de <i>Bemisia tabaci</i> .....	9
b. Ciclo biológico.....	9
c. Complejo mosca-begomovirus.....	11
4. Impacto de infección por Begomovirus en las plantaciones de tomate.....	12
5. Técnica de PCR.....	13
B. Justificación.....	14
C. Objetivos.....	15
D. Hipótesis.....	16
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
A. Metodología.....	17
1. Colecta.....	17
2. Extracción de ADN.....	22

3.	Reacción en cadena de la polimerasa para detección de <i>Begomovirus</i> .....	23
4.	Reacción en cadena de la polimerasa para detección de TYLCV.....	24
5.	Visualización de productos de PCR.....	24
III.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
A.	Unidad experimental.....	26
B.	Tamaños de muestra.....	26
C.	Análisis estadístico.....	26
D.	Programación de actividades.....	27
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
A.	Implementación de PCR para la detección de de TYLCV.....	29
B.	Resultados de muestras de mosca blanca <i>Bemisia tabaci</i> recolectadas de marzo del 2006 hasta Agosto del 2007.....	30
C.	Resultados de muestras de plantas de tomate recolectadas de marzo del 2006 hasta Agosto del 2007.....	35
D.	Resultados de muestras de plantas de tomate recolectadas el 25 y 26 de septiembre del 2007.....	38
V.	CONCLUSIONES.....	42
VI.	RECOMENDACIÓN.....	43
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	44
VIII.	APÉNDICE.....	4

## LISTA DE CUADROS

### Cuadro

1. Funciones de los genes y su nomenclatura.....5
2. Begomovirus descritos en tomate para la Región de Centroamérica .....6
3. Protocolo de extracción de ADN en tejido vegetal.....22
4. Mezcla de reacción para detección de begomovirus por PCR.....23
5. Programa de amplificación para detección de begomovirus por PCR.....24
6. Mezcla de reacción para detección de TYLCV por PCR.....25
7. Programa de amplificación para detección de TYLCV por PCR.....25
8. Resultados de las secuenciaciones de productos de PCR de Anillo de begomovirus y fragmento del TYLCV.....30
9. Resultados de PCR de muestras de mosca blanca *B. tabaci* recolectadas desde Marzo 2006 a Agosto del 2007. Resultado de la prueba de PCR para begomovirus y TYLCV.....47
10. Resultados de PCR de muestras de plantas de tomate recolectadas desde Marzo 2006 hasta Agosto del 2007. Resultado de la prueba de PCR para begomovirus y TYLCV.....53
11. Resultados de PCR de muestras de plantas de tomate recolectadas el 25 y 26 de Septiembre del 2007 en los valles de Sanarate y Salamá.....56
12. Tabla de resultados en porcentajes de las muestras positivas de mosca blanca *B. tabaci* para la prueba de PCR de detección del subgrupo Begomovirus y de TYLCV en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita. Periodo de Marzo del 2006 hasta Septiembre del 2007.....59
13. Tabla de resultados en porcentajes de las muestras positivas de plantas de tomate para la prueba de PCR de detección del subgrupo Begomovirus y de TYLCV en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita. Periodo de Marzo del 2006 hasta Septiembre del 2007.....59
14. Tabla de resultados en porcentajes de las muestras positivas de plantas de tomate para la prueba de PCR de detección del subgrupo

Begomovirus y de TYLCV en los valles de Salamá y Sanarate. Recolecta el 25 y 26 de septiembre del 2007.....	68
15. Mezcla de reacción para la amplificación parcial (gen AV) del Anillo A de Begomovirus .....	68
16. Iniciadores de PCR para la amplificación parcial (gen AV) del Anillo A de Begomovirus .....	68
17. Programa de PCR para la amplificación parcial (gen AV) del Anillo A de Begomovirus .....	68
18. Solución amortiguadora TAE 50X, para un litro .....	68
19. Solución amortiguadora TAE 1X, para un litro.. .....	68
20. Preparación de solución amortiguadora de lisis para mosca blanca.....	69
21. Preparación de solución amortiguadora de lisis para material vegetal.....	69

## LISTA DE FIGURAS

### Figura

1. Micrografía electrónica de Begomovirus: *Tomato yellow leaf curl virus* y un Mastrevirus: *Maize streak virus*.....4
2. Esquema del genoma completo de los begomovirus. Anillo genómico A y Anillo Genómico B.....4
3. Plantas con síntomas característicos de TYLCV. Recolectados en el valle de Salamá en noviembre del 2006 por el Dr. Gilbertson .....8
4. Diagrama del Ciclo de vida de *Bemisia tabaci*.....11
5. Indicación de los puntos de muestreo en un mapa de la República de Guatemala.....18
6. Diferentes omatidios de las especies de más comunes de mosca blanca para clasificación.....18
7. Parte final del abdomen de la mosca blanca para diferenciar sexos.....19
8. Diagrama de flujo del proceso para tejido vegetal de plantas de tomate.....20
9. Diagrama de flujo del proceso para mosca blanca *Bemisia tabaci*.....21
10. Cronograma de actividades.....27
11. Fotografía digital de la planta de tomate donde se recolectó la muestra 91. Síntomas característicos de TYLCV .....28
12. Visualización de productos de PCR para la prueba de detección de TYLCV en gel de agarosa al 2% en solución TAE 1X, teñido con bromuro de etidio.....29
13. Resultados en porcentajes de muestras positivas para la prueba de PCR para TYLCV y begomovirus de *B. tabaci* recolectadas en el valle de Salamá desde Marzo del 2006 a Agosto del 2007.....31
14. Resultados en porcentajes de muestras positivas para la prueba de PCR para TYLCV y begomovirus de *B. tabaci* recolectadas en el valle de Sanarate desde Junio del 2006 a Agosto del 2007.....32

15. Resultados en porcentajes de muestras positivas para la prueba de PCR para TYLCV y begomovirus de <i>B. tabaci</i> recolectadas en el valle de Asunción Mita desde Junio del 2006 a Agosto del 2007.....	33
16. Resultado en porcentajes de muestras de <i>B. tabaci</i> positivas para la prueba de PCR para la detección de TYLCV en los valles de Asunción Mita, Sanarate, y Salamá en recolecciones realizadas desde marzo 2006 hasta Agosto del 2007.....	34
17. Resultados en porcentajes de muestras de planta de tomate positivas para la prueba de PCR de TYLCV y begomovirus recolectadas en el valle de Salamá desde Septiembre del 2006 hasta Julio del 2007.....	35
18. Resultados en porcentajes de muestras de planta de tomate positivas para la prueba de PCR de TYLCV y begomovirus recolectadas en el valle de Sanarate desde Septiembre del 2006 hasta Julio del 2007.....	36
19. Plantación de tomate en el valle de Sanarate en el sector Barrial. Utilización de Agribon® en edad temprana del cultivo y con riego por goteo.....	37
20. Resultados en porcentajes de muestras de planta de tomate positivas para la prueba de PCR de TYLCV y begomovirus recolectadas en el valle de Asunción Mita desde Septiembre del 2006 hasta Julio del 2007.....	38
21. Comparación de resultados de muestra de plantas de tomate positivas para TYLCV en los distintos sectores de los valles de Salamá y Sanarate.....	39
22. Comparación de porcentajes de muestras de plantas de tomate positivas para TYLCV y begomovirus en dos valles. Valle de Sanarate y Salamá, recolecta el 25 y 26 de septiembre del 2007.....	40

## RESUMEN

Este trabajo de graduación se elaboró como parte anexa de dos proyectos, “Proyecto de Apoyo al incremento de la productividad y capacidad comercializadora de los productores asociados a FASAGUA, Fase II programa de manejo de complejo de virosis en los diferentes valles de Guatemala” y del proyecto AGROCYT No.031-2005, titulado: “Monitoreo de infección por diferentes begomovirus de *B. tabaci*, en campos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), como criterio de alerta para establecer períodos libres de hospederos de begomovirus o períodos adecuados para la siembra de tomate en diferentes regiones del país”, investigación realizada en el Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala.

Los objetivos principales de este estudio fueron los siguientes: La detección del virus del rizado amarillo del tomate, TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), en plantaciones de tomate en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita, tanto en su vector la mosca blanca *B. tabaci* como en plantas de tomate; así como discernir la fecha de ingreso de este virus a dichos valles.

Se analizaron 183 muestras de mosca blanca *B. tabaci* y 123 muestras de tejido vegetal de plantas de tomate provenientes de plantaciones de tomate de los tres valles. Adicionalmente se recolectaron 99 muestras de plantas de tomate en los valles de Salamá y Sanarate. El método de diagnóstico empleado fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores específicos para la detección de TYLCV. Se obtuvieron resultados positivos para los tres valles, lo que implica que se demostró la presencia de TYLCV en las plantaciones de tomate estudiadas. En el valle de Asunción Mita se pudo detectar que el TYLCV ya se encontraba desde marzo 2006 y en Sanarate desde junio 2006, los dos desde inicio de la colecta. Salamá se detectó la circulación de TYLCV en agosto del 2006. Por lo tanto, TYLCV ya se encuentra circulando e infectando plantaciones de tomate de los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita localizados en la República de Guatemala.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades virales son el principal problema que limita la productividad de diversos cultivos como el tomate, soya, frijol, tomatillo y chile. En el caso del tomate, los problemas causados por virus en el cultivo han aumentado considerablemente a partir de la década de los 80. Los principales virus que afectan al tomate pertenecen al género *Begomovirus* (familia Geminiviridae), que son transmitidos por mosca blanca. Dentro los *Begomovirus* reportados en el mundo, el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV, *tomato yellow leaf curl virus*) es uno de los más devastadores para el cultivo del tomate. Es común que las pérdidas ocasionadas por el TYLCV sean de hasta el 100% (Mejía 2006).

Actualmente, Guatemala ha sido una de las regiones más afectadas por el complejo mosca blanca-*Begomovirus*, tanto por el número de cultivos afectados como por las pérdidas por cosecha y el área agrícola devastada (Zembo 2003, Martínez 2001 y Mejía 2006). Las infecciones por *Begomovirus* dentro de los agroecosistemas son dinámicas e involucran factores diversos que son cambiantes, como las especies y cepas de los *Begomovirus*, los sistemas de producción, el ambiente y los biotipos del vector (Mejía 2006). Por tanto, la identificación de *Begomovirus* debe ser un proceso permanente, dado que los nuevos patógenos requieren cambios continuos en las estrategias de manejo.

Hasta el año 2006 se creía que el TYLCV no se encontraba en Guatemala. Sin embargo, una muestra vegetal procedente del valle de Salamá resultó positiva para el virus a partir de técnicas de diagnóstico molecular (Gilberson 2006, comunicación personal). Dada la severidad del virus, es importante confirmar su presencia con un mayor número de muestras de plantas y de su vector, provenientes del valle de Salamá y de otros valles con condiciones ambientales similares.

Con este estudio se demostró la presencia del *Begomovirus* TYLCV en las plantas de tomate colectadas en los valles de Sanarate, Salamá y Asunción Mita en el período comprendido de marzo del 2006 a septiembre del 2007. Los resultados serán útiles para

mejorar las estrategias de control del complejo mosca blanca–*Begomovirus* en las zonas productoras. Con esto, se espera que se inicie un proceso de alerta para poder minimizar el impacto perjudicial que pueda tener el TYLCV en la economía de los agricultores guatemaltecos.

## A. Antecedentes

### 1. *Begomovirus*.

Los geminivirus son una familia de virus patógenos de plantas que ocasionan considerables pérdidas y daños en numerosos cultivos alrededor del mundo, distribuyéndose principalmente en zonas tropicales y subtropicales. Son transmitidos por insectos vectores a una gran variedad de plantas dicotiledóneas (De la Torre 2002).

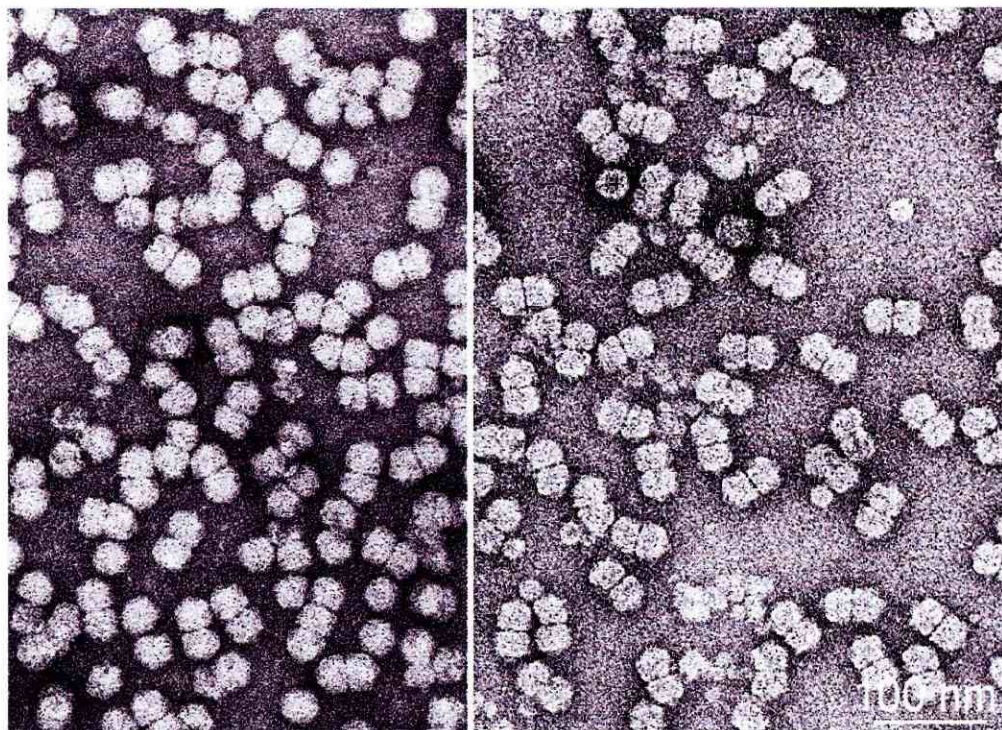
Los virus de la familia *Geminiviridae* son caracterizados por un genoma que contiene 1 ó 2 unidades de hebra simple de ADN circular encapsidado en partículas retorcidas icosaédricas. El nombre de geminivirus deriva de su morfología, ya que aparentan ser dos poliedros regulares idénticos, poliedros gemelos (De la Torre 2002).

La familia *Geminiviridae* se divide en cuatro géneros, clasificándolos según la organización del genoma, tipo de insecto vector y rango de hospedantes. El género *Begomovirus* incluye especies con uno o dos componentes genómicos, transmitidos por “mosca blanca” (*Bemisia tabaci*), e infectando mayormente plantas dicotiledóneas (Stanley *et al.* 2005).

El género *Begomovirus* contiene más de 100 especies y pertenece a la familia taxonómica de los *Geminiviridae*. La organización genómica de los *Begomovirus* (geminivirus del subgrupo III) es conservada, inclusive en los virus recientemente incorporados que son monopartitos, tal es el caso del TYLCV (Véase Figura 1). El genoma regularmente se divide en 2 componentes o unidades genómicas (Véase Figura 2). El componente A contiene toda la información que las proteínas virales requieren para la replicación, transcripción y encapsidación del ADN del virus, mientras que el componente B codifica para las proteínas involucradas en el movimiento célula a célula y el movimiento sistémico del virus en la planta, así como en el movimiento núcleo-citoplasma (Véase Figura 2 y cuadro 1).

Figura 1. *Begomovirus*: *Tomato yellow leaf curl virus* (izquierda) y un Mastrevirus: *Maize streak virus* (derecha).

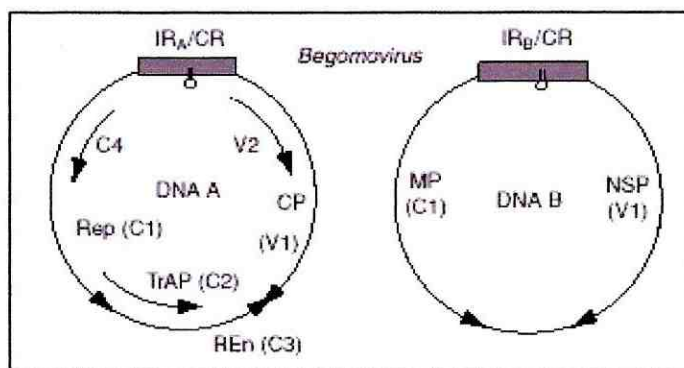
Figura 1. *Begomovirus*: *Tomato yellow leaf curl virus* (izquierda) y un *Mastrevirus*: *Maize streak virus* (derecha).



(ICTVdB 2002)

Los miembros monopartitos de este grupo (por ejemplo, los diferentes aislados del virus del rizado amarillo del tomate, TYLCV) presentan una organización genómica similar al componente A de los bipartitos. Sin embargo, es común que estos virus presenten un marco de lectura abierta adicional que se traslapa con la parte inicial del gen de la proteína de la cápside (Rivera y Ruiz 1997).

Figura 2. Esquema del genoma completo del TYLCV.



(Rybicki, 2000)

Cuadro 1. Funciones de los genes y su nomenclatura

Componente	Gen (sinónimo)	Función
A	Rep (AC1, AL1)	Iniciación de la replicación
	TrAP (AC2, AL2)	Activación de la transcripción de genes tardíos
	AC3 (AL3)	Involucrado en replicación
	CP (AV1, AR1)	Proteína de la cápside
B	BC1 (BL1)	Movimiento célula-célula
	BV1 (BR1)	Movimiento núcleo-citoplasma

(Ortiz 2007)

Por otro lado, análisis de las regiones promotoras de varios genes virales han mostrado que, aparentemente, los geminivirus han “secuestrado” una serie de señales de regulación propias de algunos genes de la planta. Esto permitiría a los virus tener un patrón de regulación y expresión que facilitará la replicación de virus en las células vegetales. También se ha sugerido que el virus ha aprendido a inducir genes que son requeridos para su replicación (Ortiz 2007).

La diversidad de los *Begomovirus* transmitidos por su vector mosca blanca se ha comenzado a estudiar recientemente en Guatemala, sin embargo, se desconoce la epidemiología de este grupo de virus, lo que representa grandes problemas para el manejo de las enfermedades que causan. Esta gran diversidad puede representarse con el gran número de reportes sobre geminivirus que infectan cultivos, principalmente el tomate de diferentes regiones del mundo.

Hasta el año 2004 sólo se habían reportado ocho grupos principales de *Begomovirus* en plantaciones de tomate en los países de Guatemala, Honduras, y Costa Rica según Nakhla *et al.* 2005 (véase cuadro 2).

De estos los más frecuentes en Guatemala fueron *Pepper golden mosaic virus*, *Pepper huasteco yellow vein virus*, *Tomato leaf curl Sinaloa virus* y *Tomato mosaic Havana virus* (Nakhla *et al.* 2005).

Cuadro 2. *Begomovirus* descritos en tomate para la Región de Centroamérica.

	Nombre del <i>Begomovirus</i>	Abreviación
1	<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	(ToSLCV)
2	<i>Tomato goldenmottle virus</i>	(ToGMoV)
3	<i>Tomato mild mottle virus</i>	(ToMiMoV)
4	<i>Tomato yellow mottle virus</i>	(ToYMoV)
5	<i>Pepper golden mosaic virus</i>	(PepGMV)
6	<i>Tomato mosaic Havana virus</i>	(ToMHV)
7	<i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i>	(ToLCSinV)
8	<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	(PHYVV)

(Nakhla *et al.* 2005)

Es necesario tomar en cuenta la inminente presencia del TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) en estas regiones. Éste aunque es originario del hemisferio oriental, han sido reportado casos en República Dominicana, Jamaica y otras regiones del Caribe (Mejía 2006, Nakhla *et al.* 1994; Czosnek y Laterrot 1997). También ya se reportó su presencia en otras partes del continente americano (Polston *et al.* 1999) y en el sur de México, muy cerca de la frontera guatemalteca (Mejía 2006). Por lo que no se descarta la posibilidad que se haya esparcido en la región de Guatemala.

## 2. TYLCV

**a. Generalidades.** La enfermedad del virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) es una de las más dañinas mundialmente para el tomate. El TYLCV ha sido conocido como el causante más importante de pérdidas en la región mediterránea y se creía que era bipartito. Otros reportes han demostrado que el TYLCV proveniente de Israel, Italia y Australia es monopartito, contrario al aislado en Tailandia (TYLVC-Th) que es bipartito. La explicación hipotética es la existencia de un virus ancestral común, seguida de un proceso de divergencia al adaptarse a los diferentes insectos y plantas hospederas (Ramírez y Maxwell 1994).

La mayoría de los *Begomovirus* poseen un genoma bipartito, compuesto de 2 componentes de aproximadamente 2.6 kb de ADN. El TYLCV es inusual ya que es un virus monopartito. Compuesto de un solo componente de ADN geonómico tiene un tamaño alrededor de 2.8 kb. Análisis de la secuencia del genoma monopartito TYLCV revela que éste contiene 6 marcos de lectura abiertos (ORF). Estas múltiples regiones codifican para proteínas de aproximadamente de 10 kDa o más. Los sitios de lectura abierta V1 y V2 (que codifica la proteína de envoltura) se encuentran en la parte responsable de la viralidad, mientras que los sitios C1, C2, C3 y C4 se encuentran en la parte complementaria del genoma. Aproximadamente 300 nucleótidos de la región intrínseca contienen el origen de replicación (Ori), el cual incluye una estructura que está envuelta en la replicación de ADNss viral (Salati *et al.* 2002).

**b. Transmisión.** El virus es transmitido obligadamente por un insecto vector, la mosca blanca de especie *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). Este vector permite la rápida y eficiente propagación del virus por su amplia e indiscriminada dieta de plantas. La transmisión es en forma persistente circulativa al alimentarse de los jugos del floema donde se encuentra localizado el virus de la planta enferma (Serra *et al.* 2006).

En general no se transmite por inoculación mecánica y no ha sido demostrada la transmisión por semilla. Para que *Bemisia tabaci* sea capaz de transmitir el virus, primero tiene que adquirirlo en fase tanto de larva como de adulto de una planta enferma. Sólo los adultos son capaces de transmitirlo alimentándose sobre éstas y picando posteriormente a otras plantas sanas. Además, las partículas virales no pasan a la descendencia, por lo que ésta debe adquirirlo nuevamente para transmitirlo. Por lo tanto, para que haya expansión de la enfermedad, es imprescindible la presencia de fuentes de inóculo (plantas enfermas) y el vector (*B. tabaci*) (Serra *et al.* 2006).

Se ha realizado estudios donde sugieren que TYLCV es capaz de localizarse en el sistema reproductor de la mosca blanca. Por lo que se ha tratado de demostrar que la transmisión de TYLCV puede estar relacionada con el sexo. Cuando las moscas tienen su

acto sexual se contaminan de TYLCV. De igual manera, se cree que existe una contaminación de TYLCV de tipo transovarial en *Bemisia tabaci* (Ghanim *et al.* 2000).

**c. Sintomatología.** Los síntomas en tomate son variados, dependiendo de muchos factores: variedad, condiciones ambientales, época, estado fenológico de la planta, etc. Se caracteriza principalmente de los demás *Begomovirus* por tener los folíolos enrollados hacia el haz (en forma de cuchara) tomando en ocasiones tonos cloróticos, verde claro o amarillentos, pudiendo aparecer ciertos tintes violetas por el envés. Las plantas paralizan su crecimiento, pudiéndose observar una reducción del tamaño de las hojas y de las distancias de los nudos, lo que en la zona de la copa suele dar un aspecto de arrellado a los brotes. El pecíolo de la hoja puede aparecer enrollado (Véase Figura 3). Puede haber abscisión de flores, falta de cuajado y frutos pueden salir más pequeños y de color más pálido. Incluso esta enfermedad presenta su sintomatología en un período más reducido que cualquiera de los demás *Begomovirus* (Serra *et al.* 2006).

Figura 3. Plantas con síntomas característicos de TYLCV. Recolectados en el valle de Salamá en noviembre del 2006 por el Departamento de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala.



(A. Avalos 2005)

### 3. Vector

**a. Generalidades de la mosca blanca *Bemisia tabaci*.** Son insectos pertenecientes a la familia *Aleyrodidae*, conocidos comúnmente como moscas blancas. Estos insectos en su estado adulto están recubiertos de una capa fina de polvo blanco con aspecto harinoso. La capa fina es producida por sus glándulas ventrales. Esta especie de *Aleyrodidae* es altamente polífaga. *Bemisia tabaci* parasita más de 300 especies de plantas, pertenecientes a 63 familias botánicas, incluyendo ornamentales, malas hierbas y cultivos hortícolas (Naranjo 2004).

*Bemisia tabaci* conocida vulgarmente como “mosca blanca de la patata” es la mosca blanca más importante en el mundo. Se presenta entre los 0-1000 m SNM, aunque se ha encontrado en mayores altitudes en algunas partes de Guatemala, Costa Rica y Panamá. Su distribución mundial parece estar relacionada con la implementación de los monocultivos y sus diferentes prácticas agrícolas. Está reportado como plaga en regiones tropicales y subtropicales de todos los continentes, a excepción de algunas regiones de Sur América ecuatorial (Carabali 2004).

**b. Ciclo biológico.** Las moscas blancas presentan cuatro estados diferenciados: huevo, larva, pupa y adulto. A su vez el estado de larva tiene tres estadios (I, II y III). Existen algunas discrepancias en la utilización del término pupa, que no lo es realmente, ya que existe alimentación en la primera parte del estado y la transformación en adultos se produce en la parte final del mismo, sin que exista una muda pupal (Naranjo 2004).

Los adultos, revestidos de una secreción cérea pulverulenta blanca, tienen los ojos de color rojo oscuro, con dos grupos de omatidias unidas en el centro por una de ellas. En reposo las alas se pliegan sobre el dorso formando un tejadillo casi rectangular. Los huevos son elípticos, asimétricos. Las larvas son ovaladas, aplanadas, de color blanco amarillento y translúcido. En todos los estadios el contorno es irregular (Naranjo 2004).

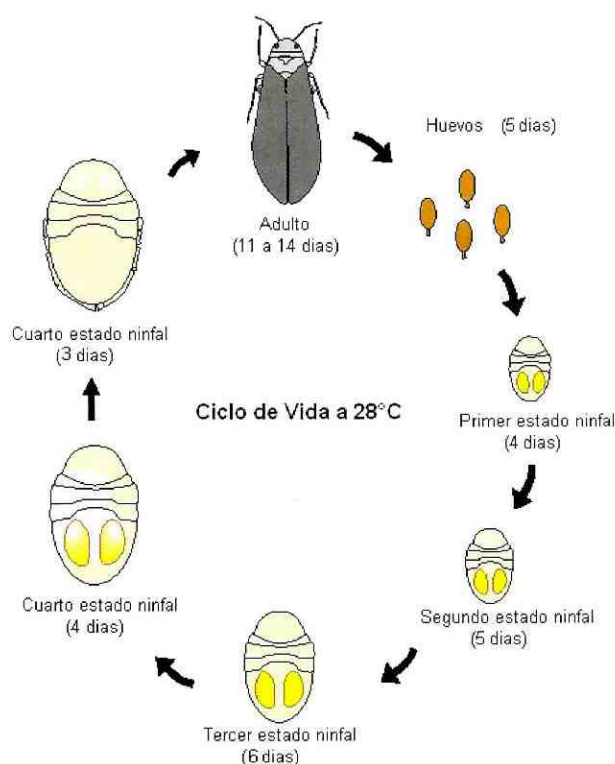
La hembra deposita preferentemente los huevos en el envés de las hojas, unidos a ellas mediante un pedicelio que es insertado en el tejido hospedante, aunque en algunos cultivos prefiere el haz. Los huevos se disponen de forma aislada, en grupos irregulares o

en semicírculos, los cuales traza a modo de abanico con su abdomen sin moverse del sitio, pues no abandona su actividad de comer mientras los pone. Pueden o no estar recubiertos por una secreción cerosa blanca (Naranjo 2004).

El estado larvario dura aproximadamente un mes (Véase figura 4). Durante los tres primeros estadios, la larva se alimentará succionando jugo de la planta de tal forma que, en caso de que ésta se secase o muriese, ella también moriría. En el primer estadio se mueve unos pocos milímetros para buscar su propio lugar y clava su aparato bucal en el tejido de la planta. El segundo estadio es típico por la cremosa transparencia y por el desarrollo de patas y antenas rudimentarias. En el tercer estadio aumenta el tamaño y es de una transparente cremosidad. En el cuarto y último estado larvario no es necesaria la ingesta de alimento, adquiere un color verde-amarillento, empieza a abultarse y se hacen visibles dos ojos rojos. Transcurridas las cuatro semanas emerge el adulto de la pupa (Naranjo 2004).

El tiempo de desarrollo de esta especie de mosca blanca depende principalmente de la temperatura, de la planta huésped y de la humedad. Algunos investigadores han estudiado la duración del desarrollo de huevo a insecto adulto a diferentes temperaturas. En algodón el ciclo suele ser de dos a tres semanas en verano. El tiempo necesario para el desarrollo es menor según aumentan las temperaturas. El desarrollo del insecto es óptimo a temperaturas altas (unos 30-33° C). Por encima de 33° C el ritmo de desarrollo decrece rápidamente de nuevo. No sólo es importante el tipo de planta huésped, sino también la nutrición de la misma. Situaciones de estrés tales como una baja intensidad luminosa, altas temperaturas y extrema humedad, pueden influir sobre el desarrollo directa o indirectamente (Naranjo 2004).

Figura 4. Diagrama del ciclo de vida de *Bemisia tabaci*.



Los adultos miden aproximadamente 1 mm de longitud, siendo las hembras son más grandes que los machos. En reposo las alas son de color blanco-crema, forman una especie de techo sobre el abdomen y mantienen los lados paralelos. Por lo general, sobre todo en los machos, las alas quedan levemente separadas. El adulto recién emergido es de color amarillo pálido y sus alas son ligeramente transparentes, aunque luego adquieren un color blanco debido al polvo (Carabali 2004).

**c. Complejo mosca-*Begomovirus*.** Existen tres etapas para la transmisión de los virus: adquisición del virus desde una planta infectada, retención del virus en el vector e inoculación de éste en una planta sana. Los virus persistentes circulativos como *Begomovirus* transmitidos por la mosca blanca *B. tabaci*, son aquellos que necesitan ser adquiridos desde el floema de la planta y transportados hasta la cavidad hemolinfática (hemocele) después de atravesar el digestivo posterior. Luego de la hemolinfa, el virus baja hasta las glándulas salivares accesorias donde la lámina basal forma vesículas alrededor de la partícula viral mediante pinocitosis que luego son transportadas por

exocitosis hasta el canal salivar. Finalmente, los viriones son transportados desde el canal salivar a la planta durante la salivación en tejidos floemáticos. Todos estos procesos (adquisición, latencia e inoculación) requieren un período para que el vector pueda ser virulífero. Se ha observado que el tiempo de adquisición óptimo debe ser de 12 a 24 horas, latencia de 4 a 12 horas e inoculación de 24 a 48 horas (Rosell *et al.* 1999).

Viriones de geminivirus se han detectado en el contenido digestivo tanto de *B. tabaci* como de *T. vaporariorum*, indicando que se encuentra en el sistema digestivo de ambas especies. Por el contrario, únicamente se han detectado partículas virales en la saliva y hemolinfa de *B. tabaci*, pero no en *T. vaporariorum*. Esto indica que ambas especies son capaces de ingerir el virus, pero sólo en *B. tabaci* los viriones atraviesan la barrera del sistema digestivo y entran a la hemolinfa (o pasan a las glándulas salivares). Sugiriendo que el epitelio digestivo de *T. vaporariorum* no permite el paso de los viriones desde el sistema digestivo hasta la hemocele. Posiblemente esta especie contiene estructuras anatómicas especializadas que delimitan su movimiento (Rosell *et al.* 1999).

#### **4. Impacto de infección por Begomovirus en las plantaciones de tomate**

Según la Federación de Asociaciones Agrícolas de Guatemala (FASAGUA), entre los efectos negativos de la virosis por *Begomovirus* está la fuga de divisas debida al incremento en el uso de agro insumos e importación de pasta y concentrados de tomate; menor área sembrada, por consiguiente mano de obra reducida; amenaza del sector por otros países más eficientes en la producción de estos cultivos y precios altos al consumidor (FASAGUA 2007).

En Salamá se cultivan 2000 manzanas de tomate. Una buena productividad se considera a 2000 cajas de 50 libras por manzana (equivalente a unos 65 mil Kg/ha), mientras que la media es de solamente 1000 cajas. Se identifica como el problema de mayor importancia a las deficiencias de manejo del cultivo, aunque presenta como problemas serios a las bacteriosis, fungosis, y virosis; en este caso asociados al problema de mosca blanca *Bemisia tabaci*, que transmite *Begomovirus*, entre ellos el TYLCV (Zembo 2003).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se recalca la importancia de llevar a cabo estudios (de carácter urgente) para proponer soluciones a fin de contrarrestar el problema aplicando estrategias que han funcionado en otros países y que ya aplicadas en algunos valles en Guatemala se han obtenido excelentes resultados (FASAGUA 2007).

### **5. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento (Weissensteiner 2003).

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN. Tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo (Weissensteiner 2003).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas (Weissensteiner 2003).

## B. Justificación

El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV, por sus siglas en inglés) es considerado por algunos autores uno de los más peligrosos por los daños que provoca en las cosechas (Rubio 2002 y Bejarano 2003). Uno de los cultivos más afectados es el del tomate. En Guatemala se producen anualmente más de 57,000 toneladas de tomate (Zembo 2003), lo cual representa un importante rubro para la economía del país. Hasta el momento no se ha comprobado la presencia del TYLCV en el territorio nacional, sin embargo, se ha reportado recientemente en el Valle de Salamá plantas de tomate con una sintomatología muy similar a la que provoca este virus. En el año 2006, el laboratorio del Dr. Robert Gilbertson de la Universidad de Davis, California, confirmó por técnicas moleculares la presencia de este virus en una planta procedente de Salamá (Gilbertson 2006, comunicación personal).

Para confirmar la presencia de este *Begomovirus* en Guatemala es necesario buscarlo en las áreas de producción de tomate con condiciones climáticas similares a la de la región en donde se observó por primera vez. Por ello se eligieron los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita. Para que la detección sea completa, el muestreo en las plantaciones debe incluir plantas de tomate con síntomas y su vector mosca blanca *Bemisia tabaci*. Hasta ahora, los estudios realizados demuestran que la mosca blanca de la especie *B. tabaci* es el vector más eficiente de muchos *Begomovirus*, incluyendo el TYLCV (Naranjo 2004).

Según FASAGUA (2007) es importante realizar estudios para confirmar la presencia del TYLCV en el país. De ser así, los resultados de este estudio servirán para mejorar las estrategias de control de mosca blanca en las regiones afectadas, ya que en la actualidad éstos no consideran la presencia del TYLCV. Los protocolos de control mejorados pueden ayudar a reducir el impacto a futuro y la dispersión a otras regiones en el territorio guatemalteco.

## **C. Objetivos**

### **1. Objetivos generales**

- Determinar la presencia de TYLCV en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita.

### **2. Objetivos específicos**

- Implementar una prueba diagnóstica molecular específica para detección de la infección por el TYLCV en Guatemala.
- Comprobar mediante la técnica de la PCR, la presencia del TYLCV en muestras de tejido vegetal de tomate colectadas en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita.
- Verificar por la técnica de PCR, la presencia del TYLCV en extractos de *Bemisia tabaci* colectadas en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita.

#### **D. Hipótesis**

Se proponen las siguientes hipótesis:

- El *Begomovirus Tomato Yellow leaf curl virus* (TYLCV) está presente en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita.
- La técnica de PCR es adecuada para determinar la presencia de TYLCV en tejido vegetal de tomate y en su vector, la mosca *B. tabaci*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Metodología

**1. Colecta.** Las muestras de plantas de tomate y de mosca blanca fueron colectadas por el personal de FASAGUA, como parte de las actividades de “Proyecto de apoyo al incremento de la productividad y capacidad comercializadora de los productores asociados a FASAGUA, Fase II programa de manejo de complejo de virosis en los diferentes valles de Guatemala” y del proyecto AGROCYT No.031-2005, titulado: “Monitoreo de infección por diferentes *Begomovirus* de *B. tabaci*, en campos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), como criterio de alerta para establecer períodos libres de hospederos de *Begomovirus* o períodos adecuados para la siembra de tomate en diferentes regiones del país”, durante el período comprendido desde marzo del 2006 hasta septiembre de 2007. Los puntos de muestreo fueron campos productores de tomate ubicados en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita (Véase Figura 5). El tejido vegetal recolectado fueron hojas que presentaban síntomas de infección por *Begomovirus*. La recolección se realizó mensualmente en cada punto de muestreo, cada uno de los cuales representa una plantación.

Las muestras de moscas blancas son colectadas en estado adulto en el envés de las hoja de las planta de tomate. Para la recolección se utiliza un aspirador y las moscas son transportadas al laboratorio en etanol al 80%.

Las muestras de tejido vegetal fueron colectadas en bolsas plásticas con cierre y debidamente rotuladas con la fecha y el punto de colecta. Todas las muestras de tejido vegetal y mosca blanca fueron transportadas en frío al Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala donde fueron ingresadas a la base de datos del proyecto, registrándose la fecha, el valle, el campo, el cultivo, la edad del cultivo y la sintomatología. Posteriormente las muestras de tejido vegetal fueron almacenadas a 4° C con desecante, previa liofilización. En el caso de las moscas blancas fueron clasificadas por especie y sexo según Palmieri *et al.* 2007, utilizando como criterio principal la descripción de los omatidios en la cabeza para la

determinación de la especie (figura 6). El sexo se determinó utilizando como indicador el segmento final del abdomen (figura 7).

Figura 5. Indicación de los puntos de muestreo en un mapa de la República de Guatemala (Avalos 2008).

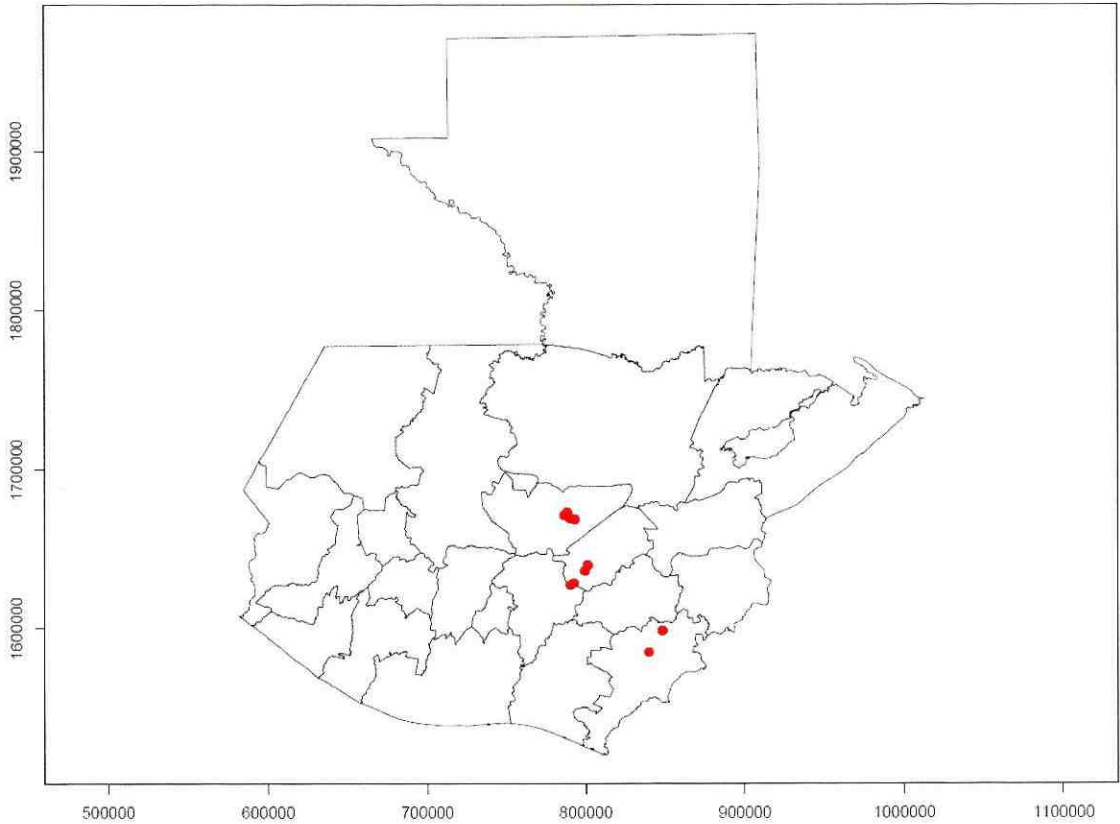


Figura 6. Diferentes omatidios de las especies más comunes de mosca blanca para clasificación (Tomado de Palmieri *et al.* 1999)

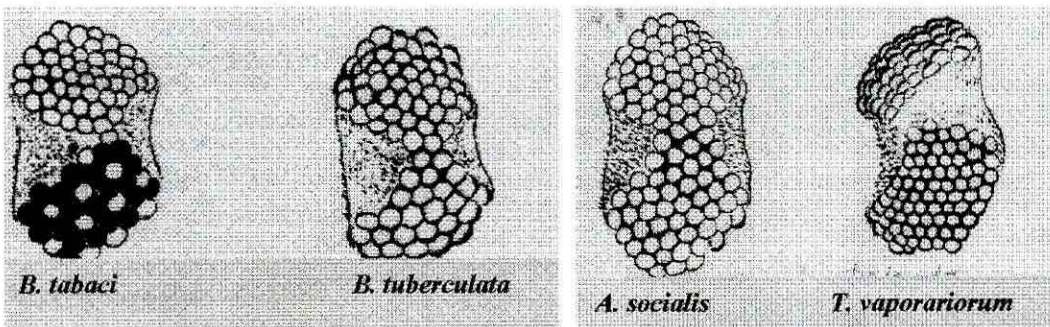
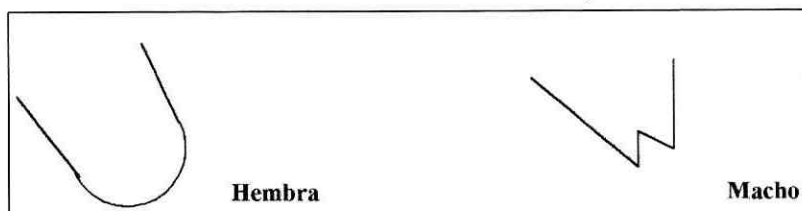


Figura 7. Parte final del abdomen de la mosca blanca para diferenciar sexos (Tomado de Palmieri *et al.* 1999).



Adicionalmente se realizó una colecta dirigida a plantas con síntomas similares a los presentados por la infección de TYLCV. La colecta se realizó el 25 y 26 de septiembre del 2007, en los valles de Sanarate y Salamá. En total se recolectaron 99 muestras de tejido vegetal. Estas no se liofilizaron y se trataron en fresco, siguiendo el proceso indicado en la figura 8 para plantas de tomate y figura 9 para mosca blanca.

Figura 8. Diagrama de flujo del procesamiento de tejido vegetal de plantas de tomate.

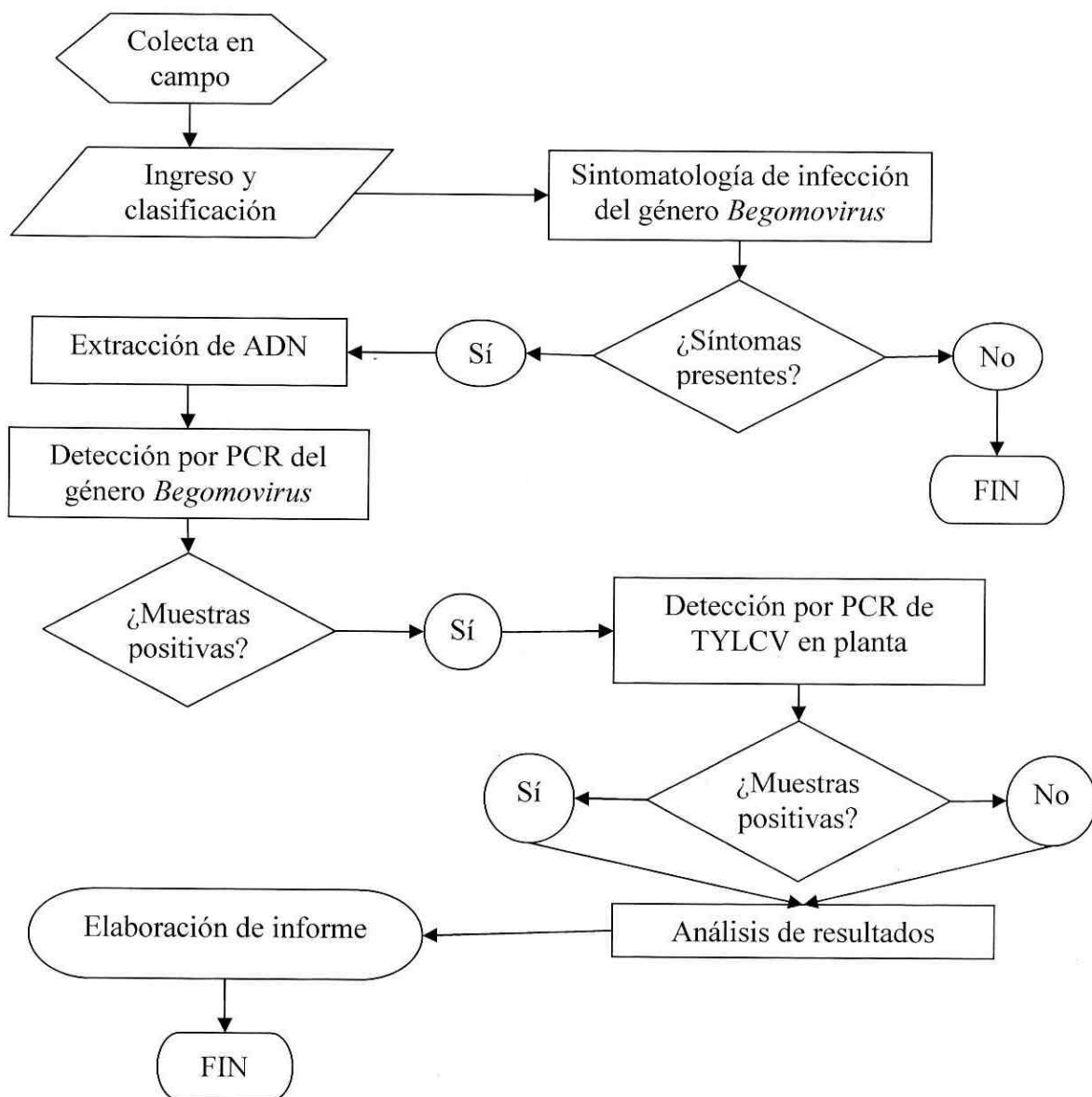
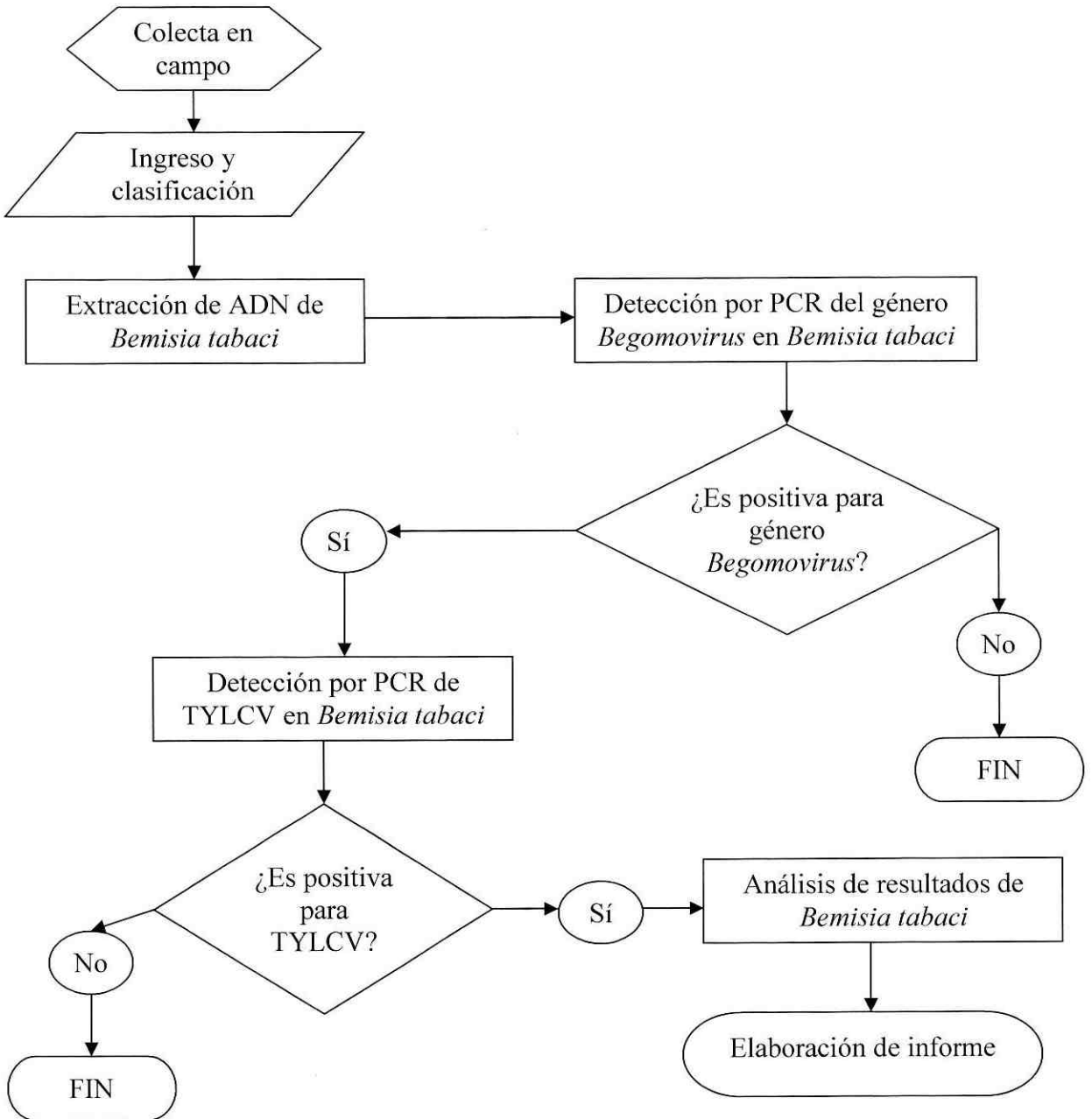


Figura 9. Diagrama de flujo del procesamiento de mosca blanca *Bemisia tabaci*.

**2. Extracción de ADN.** El protocolo de extracción de ADN utilizado en plantas es una modificación del protocolo propuesto por Faria y Maxwell 1999 (ver Cuadro 3).

Cuadro 3. Protocolo de extracción de ADN en tejido vegetal.

1	En un tubo de 1.5 ml, colocar 1cm <sup>2</sup> de tejido seco y 1.0 ml de solución amortiguadora de extracción para material vegetal (100 mM Tris-HCl (Sigma), 50 mM EDTA (Sigma) pH 8.0, 500 mM NaCl (Merck) y 10 mM 2-mercaptoetanol, macerar con un pistilo el tejido vegetal y centrifugar por 10 minutos a 12,500 rpm.
2	Transferir 500 µl del sobrenadante a un tubo de 1.5 ml y agregar 66 µl de SDS (J.T. Baker) 10%. Agitar con vórtex. Incubar a 65° C por 10 min..
3	Agregar 160µl de acetato de sodio (Merck) 5 M, pH 5.5. Agitar con vórtex. Centrifugar a 12,500 rpm por 10 min.
4	Transferir el sobrenadante a otro tubo y agregar 200 µl de fenol (Merck) y 200 µl de cloroformo (Merck): alcohol isomílico (J.T.Baker) (24:1). Agitar con vórtex y centrifugar a 12,500 rpm por 10 min.
5	Transferir el sobrenadante a otro tubo.
6	Precipitar el ADN con 0.6 volúmenes de isopropanol (Merck) e incubar por 2 horas a -20° C.
7	Lavar el precipitado con etanol (Mario Bathen) al 95%. Centrifugar por 10 minutos a 12,500 rpm y remover el etanol presente por decantación y evaporación.
8	Lavar el precipitado etanol (Mario Bathen) al 70%. Centrifugar por 10 minutos a 12,500 rpm y remover el etanol presente por decantación y evaporación.
9	Secar el precipitado y resuspenderlo en 500 µl de agua destilada estéril.
10	Almacenar el ADN extraído a -20° C.

El ADN de la mosca blanca *B. tabaci* se obtuvo del banco de ADN del Proyecto AGROCYT 031-2005: Monitoreo de infección por diferentes *Begomovirus* de *B. tabaci*, en campos de tomate, como criterio de alerta para establecer períodos libres de hospederos de *Begomovirus* o períodos adecuados para la siembra del tomate en diferentes regiones del país. Brevemente, el protocolo de extracción consiste en lo siguiente: Se forman grupos de 1 a 5 moscas y se le agrega 10 µl de solución de lisis (Proteinasa K (Promega) 0.01%, Tris-HCl (Sigma) 5 mM pH 8, EDTA (Sigma) 0.5 mM pH 8, Nonidet P-40 (Sigma) 0.5%) y se macera con un pistilo plástico sobre una caja

petri forrada con papel aluminio y parafilm, hasta obtener una consistencia uniforme. A la muestra se le agrega otros 100  $\mu$ l de solución amortiguadora de lisis y se calienta por 15 minutos a 95° C, inmediatamente se coloca en hielo si van a ser trabajadas inmediatamente, de lo contrario, se almacena a -20° C.

**3. PCR para detección de *Begomovirus* en planta y mosca blanca *Bemisia tabaci*.** El PCR para la detección de *Begomovirus* se detalla en los cuadros 4 y 5. Se utilizaron los cebadores degenerados p514 (5' GCC WTG TAM AGR AAG CCM AG 3') y p1048 (5' GGR TTD GAR GCA TGH GTA ACA TG '3). El control positivo utilizado proviene de muestras de planta recolectadas a través del proyecto AGROCYT 031-2005, mencionado anteriormente. El producto de amplificación esperado era de aproximadamente 544 pb.

Cuadro 4. Mezcla de reacción para detección de *Begomovirus* por PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen de trabajo para plantas	Volumen de trabajo para mosca blanca
Agua doble destilada	--	--	15.75 $\mu$ l	12.25 $\mu$ l
Solución amortiguadora Taq (Promega)	10X	1X	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	25 mM	2.5mM	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
Cebador p514 (Invitrogen)	20 mM	0.6 mM	0.75 $\mu$ l	0.75 $\mu$ l
Cebador p1048 (Invitrogen)	20 mM	0.6 mM	0.75 $\mu$ l	0.75 $\mu$ l
dNTP's (Promega)	2.5 mM	0.15 mM	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
Taq ADN polimerasa (Promega)	5 U/ $\mu$ l	0.05 U/ $\mu$ l	0.25 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
ADN	--	--	1 $\mu$ l	4.5 $\mu$ l

Cuadro 5. Programa de amplificación para detección de *Begomovirus* por PCR

Paso 1:	2 minutos a 95°C
Paso 2:	1.30 minutos a 95°C
Paso 3:	1.30 minutos a 58°C
Paso 4:	1.30minuto a 72°C
Realizar 30 ciclos del paso 2 al 4	
Paso 5:	10 minutos a 72°C
Paso 6:	4°C indefinidamente

**4. PCR para detección de TYLCV.** La detección de TYLCV por PCR se llevó a cabo según se describe en Nakhla *et al.* 2005 utilizando termociclador PTC-100 Marca MJ Research. Los cebadores de IDT utilizados son los PTYIRv21 (5' TTG AAA TGA ATC GGT GTC CC 3') y PTYIRc287 (5' TTG CAA GAC AAA AAA CTT GGG ACC 3') que amplifican un fragmento de 287 pb. La mezcla de reacción y las condiciones para la PCR se detallan los cuadros 6 y 7.

El control positivo utilizado es un extracto de ADN obtenido de una planta de tomate que presentaba síntomas característicos de infección por TYLCV. El producto de amplificación tanto para TYLCV como para el anillo A fue secuenciado (Vease cuadro 16 al 18 en anexo; receta secuencia y programa para amplificación del anillo A). La secuenciación se realizó por la empresa MacroGen® USA. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias publicadas en GenBank de NCBI por medio del programa informático CLC Combined Workbench 3.0.3.

**5. Visualización de productos de PCR.** Los productos de PCR para la detección de *Begomovirus* general se visualizaron en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X con una migración a 85 voltios durante 40 minutos.

Los productos de amplificación de TYLCV se visualizaron en gel de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE 1X con una migración de 90 voltios durante 70 minutos. Las migraciones se realizaron en una cámara de electroforesis horizontal Mod E0638). En cada uno de los pozos del gel de agarosa se cargaron 7µl del producto de PCR con 1µl de solución amortiguadora de montaje. Luego de la migración, los geles se tiñeron con bromuro de etidio. Se visualizaron en un transluminador con radiación ultravioleta y se tomó una fotografía digital (Véase Apéndice G y H).

Cuadro 6. Mezcla de reacción para detección de TYLCV por PCR

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen de stock para moscas blanca	Volumen de stock para plantas
Agua doble destilada	--		7.3 $\mu$ l	8.3 $\mu$ l
Buffer para Taq	10X	1X	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	30mM	3mM	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
Cebador PTYIRv21	10mM	0.8mM	1.8 $\mu$ l	1.8 $\mu$ l
Cebador PTYIRc287	10mM	0.8mM	1.8 $\mu$ l	1.8 $\mu$ l
dNTP's	2.5Mm	0.25mM	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
Taq ADN polimerasa	5U/ $\mu$ l	0.04U/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l
ADN	20ng/ $\mu$ l	4 ng/ $\mu$ l	6 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Cuadro 7. Programa de amplificación para detección de TYLCV por PCR

Paso 1:	1 minuto a 94°C
Paso 2:	2 minutos a 55°C
Paso 3:	2 minutos a 72°C
Realizar 30 ciclos del paso 1 al 3	
Paso 4:	1 minutos a 94°C
Paso 5:	2 minutos a 61°C
Paso 3:	7 minutos a 72°C
Paso 3:	Indefinido a 18°C

## **B. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **1. Unidad experimental**

Plantas de tomate con síntomas de infección por *Begomovirus*, y moscas blancas *Bemisia tabaci* colectadas en plantaciones de tomate en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita.

### **2. Tamaño de muestra**

La recolecta se realizó de marzo del 2006 hasta agosto de 2007. Se recolectaron mensualmente 5 muestras del valle de Salamá, 4 muestras del valle de Sanarate y 2 muestras del valle de Asunción Mita, una en cada punto de muestreo que corresponden a un campo o plantación de tomate distantes entre sí. En cada punto de muestreo se tomó una muestra de planta y se capturaron moscas blancas. Debido al alto costo de las pruebas, la búsqueda de TYLCV se hizo únicamente en plantas que presentaban síntomas para aumentar la probabilidad para detectar el virus. En total se procesaron 183 muestras de moscas blancas *B. tabaci* y 123 muestras de plantas de tomate procedentes de los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita (ver Apéndices A y B).

Finalmente, el 25 y 26 de septiembre se realizó una colecta en los valles de Sanarate y Salamá. En el valle de Sanarate se recolectaron 32 muestras de plantas de tomate en dos diferentes sectores del valle denominados campo 1 y campo 2. En el sector central del valle de Salamá se recolectaron 21 muestras de plantas de tomate. En el sector del sur del valle de Salamá se recolectaron 30 muestras de planta de tomate, mientras que en el sector del norte del valle de Salamá se recolectaron 34 muestras (Ver Apéndice C).

### **3. Análisis estadístico**

Las variables independientes en este estudio fueron: (a) la región de colecta, (b) la fecha de colecta, y (c) presencia de sintomatología de infección por *Begomovirus*. Las variables dependientes que se usarán son: (a) resultado de PCR para detección del subgrupo *Begomovirus*, (b) y resultado de PCR para la detección de TYLCV.



### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### A. Implementación PCR para detección de TYLCV

Para poder implementar una prueba de PCR confiable, se requería un control positivo para TYLCV. Para ello se eligieron muestras de plantas de tomate que presentaban síntomas característicos de infección por TYLCV (Véase figura 9). Dichas muestras se recolectaron el 25 y 26 de septiembre del 2007 en los valles de Sanarate y Salamá (Véase en apéndice, Tabla 16). Las muestras elegidas fueron la 89, 90 (dividida en 9 sub-muestras), 91 y 92.

Figura 9. Fotografía digital de la planta de tomate que corresponde a la muestra 91 con síntomas característicos de TYLCV.

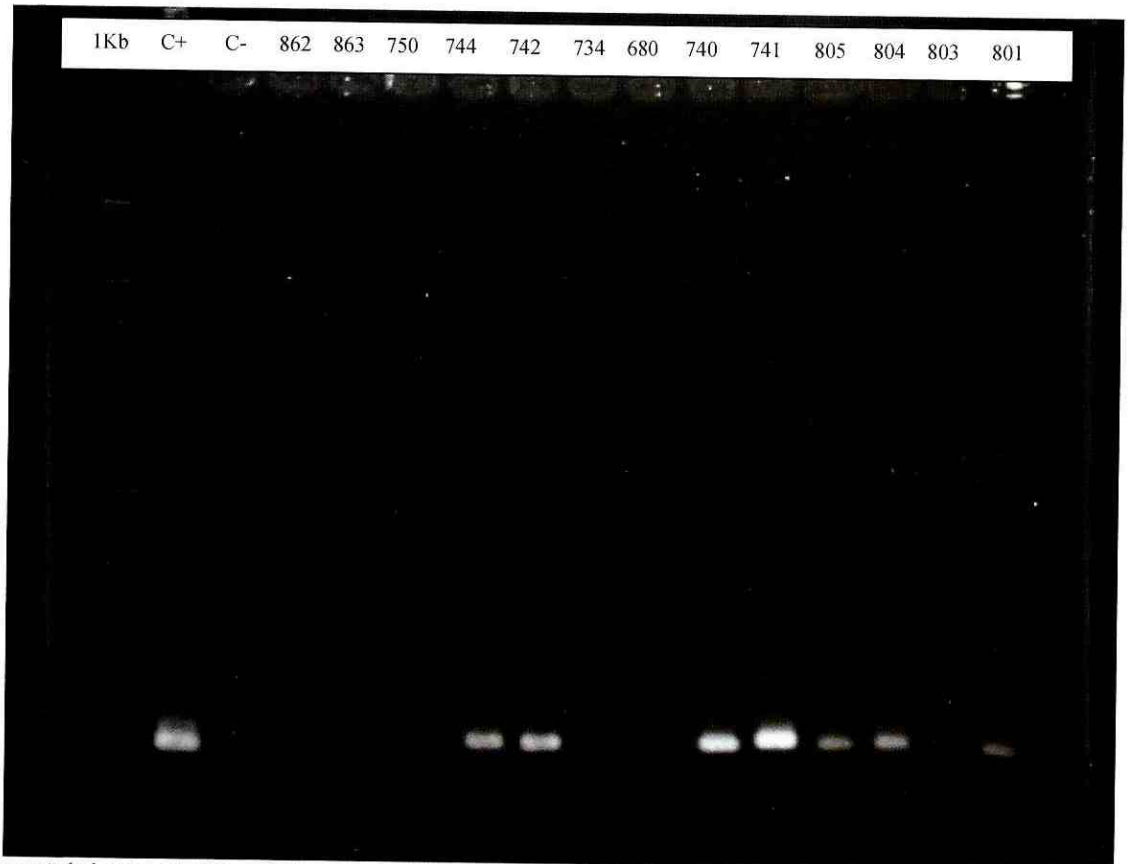


(Estuardo Solares, 2007)

En las muestras 89, 90.1, 90.2, 90.7, 91 y 92 se efectuó la extracción del ADN, se les realizó el PCR para la detección de TYLCV y se obtuvo un producto de amplificación del tamaño (287pb) como se muestra en la figura 10. Para corroborar el resultado anterior se

realizó una PCR para la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1100 bp, correspondiente al anillo A de los *Begomovirus*.

Figura 10. Visualización de productos de PCR para la prueba de detección de TYLCV en gel de agarosa al 2% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio.



Pozos señalados con el código de las muestra de mosca blanca *B. tabaci*. De izquierda a derecha: (1) escalera de masa molecular de 1kb) (Promega®), (2) Control positivo de ADN viral de muestra 91, (3) Control negativo ADN de planta sana, (7, 8, 11-16) muestras positivas 744, 742, 740, 741, 805, 804, 803 y 801.

Los resultados de la secuenciación de los productos de amplificación de TYLCV y anillo A de los *Begomovirus* se describen en el Cuadro 8 (Véase Apéndice I, J y K). Los resultados de la secuenciación de los fragmentos amplificados del anillo A del *Begomovirus* presente confirman la presencia de TYLCV en las muestras 90.7 y 91 con una similitud del 99% y 100% respectivamente con el genoma completo del TYLCV reportado en el GeneBank de NCBI.

Cuadro 8. Resultados de las secuenciaciones de productos de PCR de anillo de *Begomovirus* y fragmento del TYLCV (Véase Apéndices L, M y N).

Muestra	Fragmento Amplificado	Genoma del Gen bank con mayor similitud	Porcentaje de similitud (%)
89	Anillo de <i>Begomovirus</i> (prAC1154 y prAV2644)	<i>Pepper golden mosaic virus</i> cepa <i>Tamaulipas</i> componente A, secuencia completa	97%
90.7	Anillo de <i>Begomovirus</i> (prAC1154 y prAV2644)	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> , genoma completo	99%
91	Anillo de <i>Begomovirus</i> (prAC1154 y prAV2644)	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> , genoma completo	100%

Resultados por [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

Como puede observarse en el cuadro anterior, la secuencia obtenida para la muestra 89 resultó tener una mayor similitud a *Pepper golden mosaic virus*. Era de esperarse que este *Begomovirus* resultara positivo en alguna de las muestras ya que según estudios recientes este es el *Begomovirus* más abundante en los valles tomateros del país (Ortiz 2007).

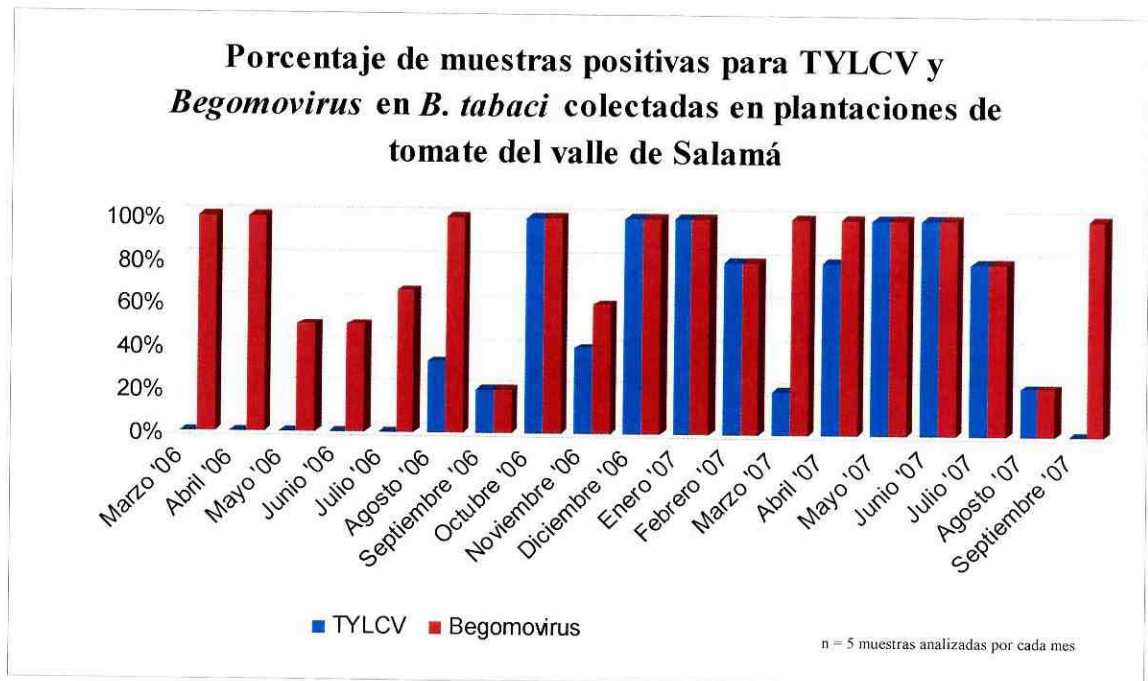
Debido a que las muestras 90.7 y 91 presentaron un porcentaje de similitud del 99% y del 100% respecto a las secuencias publicadas en el GeneBank de TYLCV, se determinó que éstas eran las muestras indicadas para ser utilizadas como control positivo en las pruebas de PCR para la detección de TYLCV y para la detección de *Begomovirus* en plantas de tomate y mosca blanca *B. tabaci*.

#### **B. Resultados de muestras de mosca blanca *B. tabaci* recolectadas de marzo del 2006 a agosto del 2007.**

Los resultados de las muestras de mosca blanca *B. tabaci* muestran claramente el circulamiento del virus en cada uno de los valles (Salamá, Sanarate y Asunción Mita) (Véase Apéndice D).

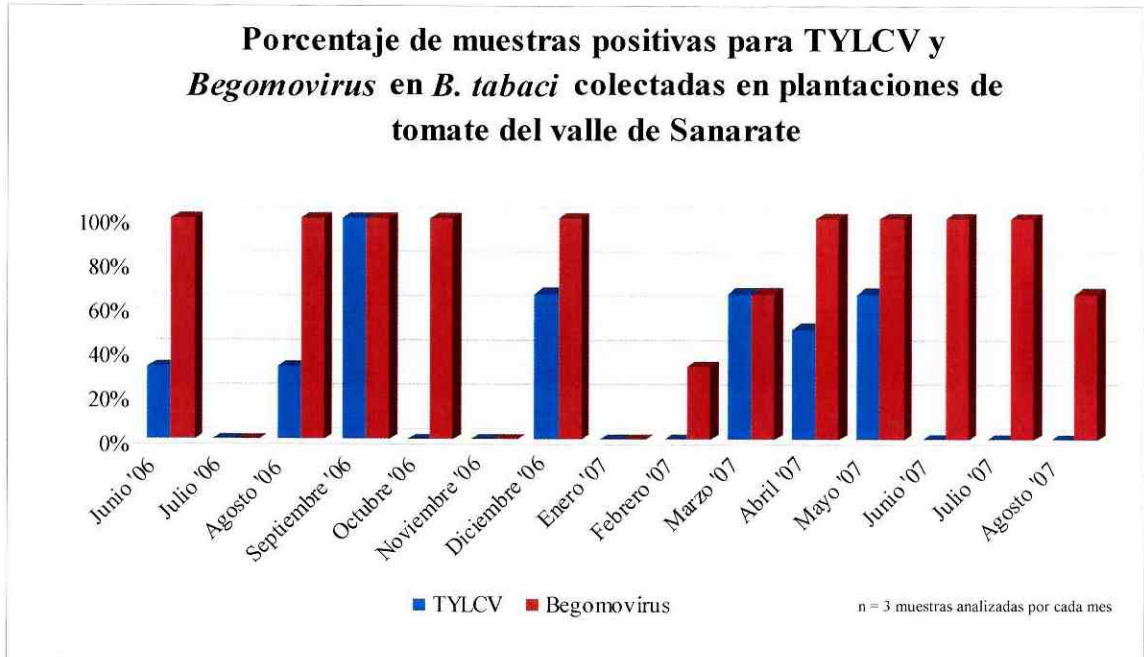
En el caso del valle de Salamá, se han colectado muestras de mosca blanca desde marzo del 2006. Como puede observarse en la figura 11, la presencia de TYLCV se detectó por primera vez en las muestras de mosca blanca *B. tabaci* colectadas el mes de agosto del año 2006.

Figura 11. Resultados en porcentajes de muestras positivas para la prueba de PCR para TYLCV y *Begomovirus* en *B. tabaci* recolectadas en el valle de Salamá desde marzo del 2006 a agosto del 2007.



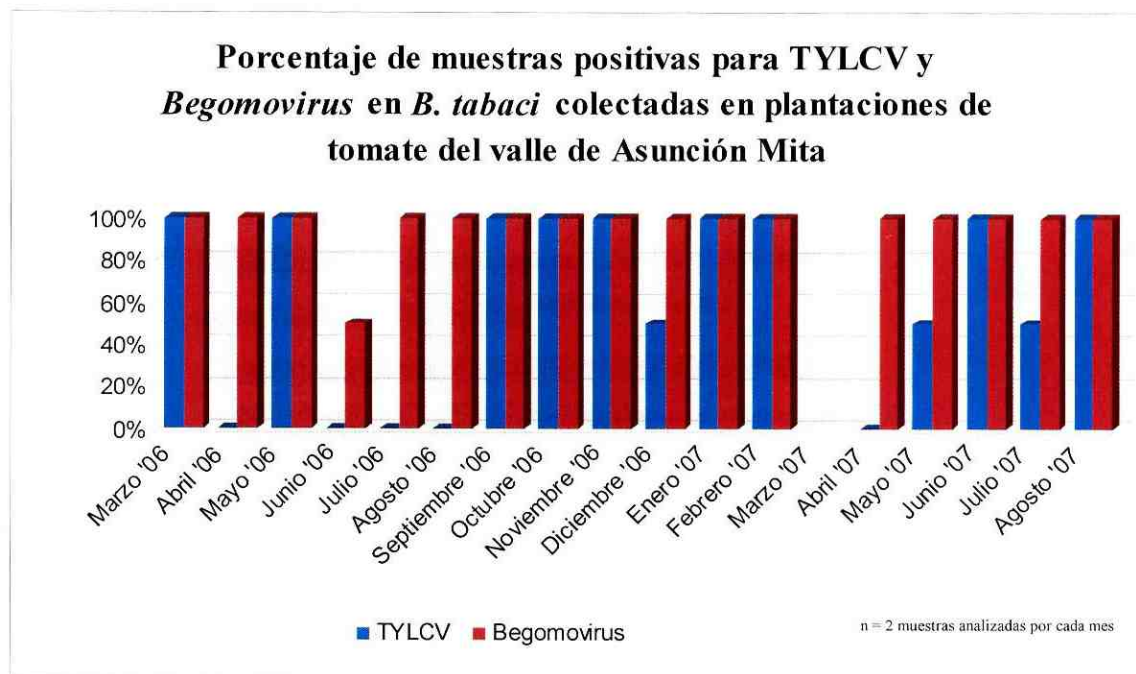
Como se indica en la figura 12, en el valle de Sanarate, las muestras colectadas resultaron positivas desde que se iniciaron las colectas en este valle en el mes de junio de 2006. Sólo en los meses de junio, julio y agosto de 2007 se observa que disminuyó considerablemente la presencia de TYLCV, así como del género *Begomovirus* en general. Esto último pudo deberse a que las lluvias son un factor de control natural de la mosca blanca y por tanto al disminuir las poblaciones circulantes del vector, disminuye la probabilidad de que éstos adquieran el inóculo viral.

Figura 12. Resultados en porcentajes de muestras positivas para la prueba de PCR para TYLCV y *Begomovirus* de *B. tabaci* recolectadas en el valle de Sanarate desde junio del 2006 a agosto del 2007.



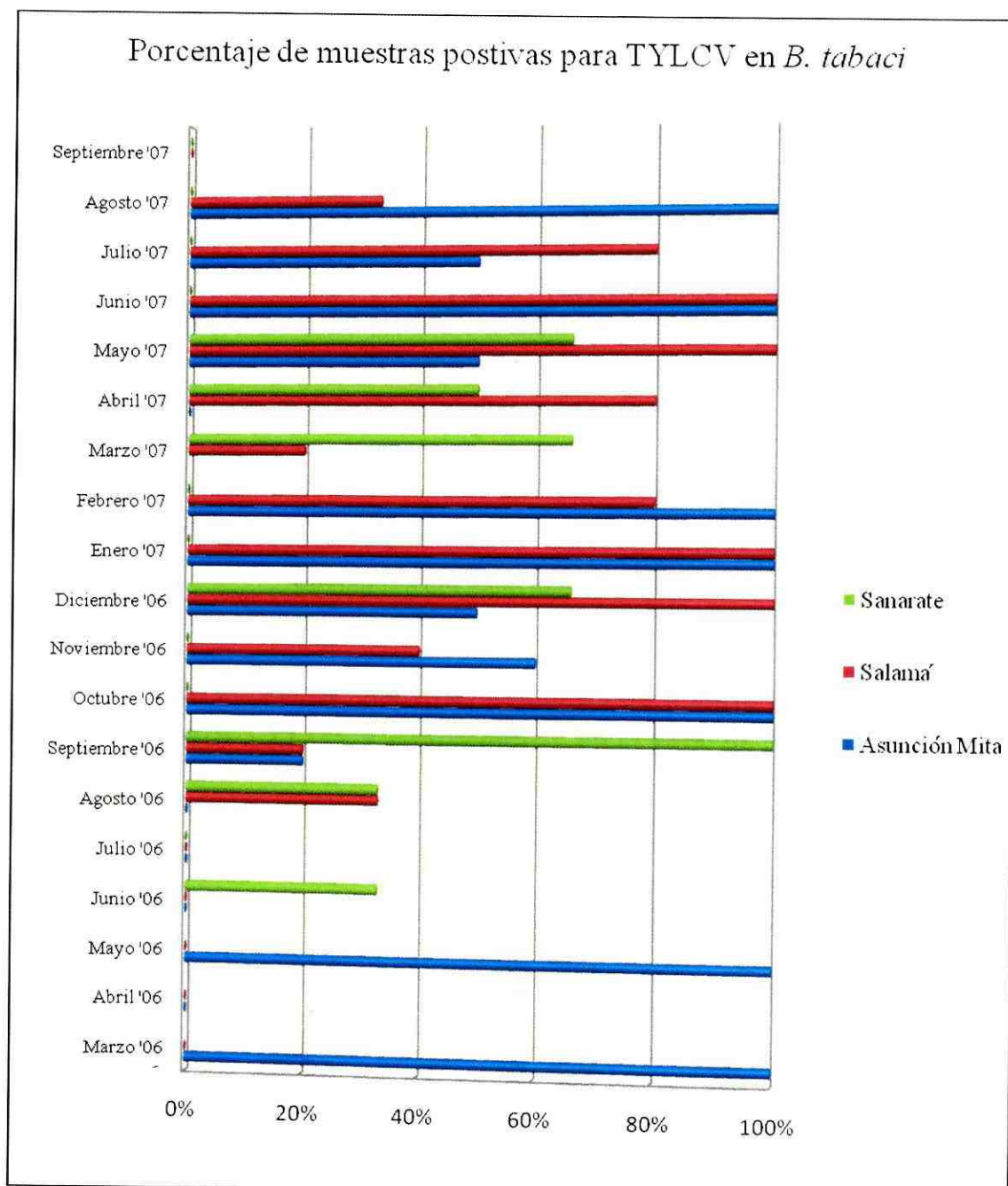
Como se observa en la Figura 13, en el valle de Asunción Mita se detectó la presencia de TYLCV en las plantaciones de tomate desde marzo del año 2006, cuando se iniciaron las colectas en este valle. Lo que indica el circulamiento del virus en el valle. Estos resultados sólo indican el circulamiento del virus y no una infección por el virus.

Figura 13. Resultados en porcentajes de muestras positivas para la prueba de PCR para TYLCV y *Begomovirus* en *B. tabaci* recolectadas en el valle de Asunción Mita desde junio del 2006 a agosto del 2007.



En la figura 14 se puede observar un resumen de los resultados de la presencia de TYLCV en su vector la mosca blanca *B. tabaci*. Se muestra que el primer valle que se le detectó la circulación de TYLCV es el valle de Asunción Mita en marzo del 2006. Sin embargo, no puede determinarse exactamente desde cuando está presente este virus en los vectores ya que fue detectable desde el inicio de las colectas. El mismo caso presenta el valle de Sanarate en donde las colectas iniciaron en junio de 2006, mismo mes en que se detectó la presencia de TYLCV. Esto es un indicador que describe la presencia de TYLCV en el vector que está circulando en las plantaciones de tomate de cada una de las zonas.

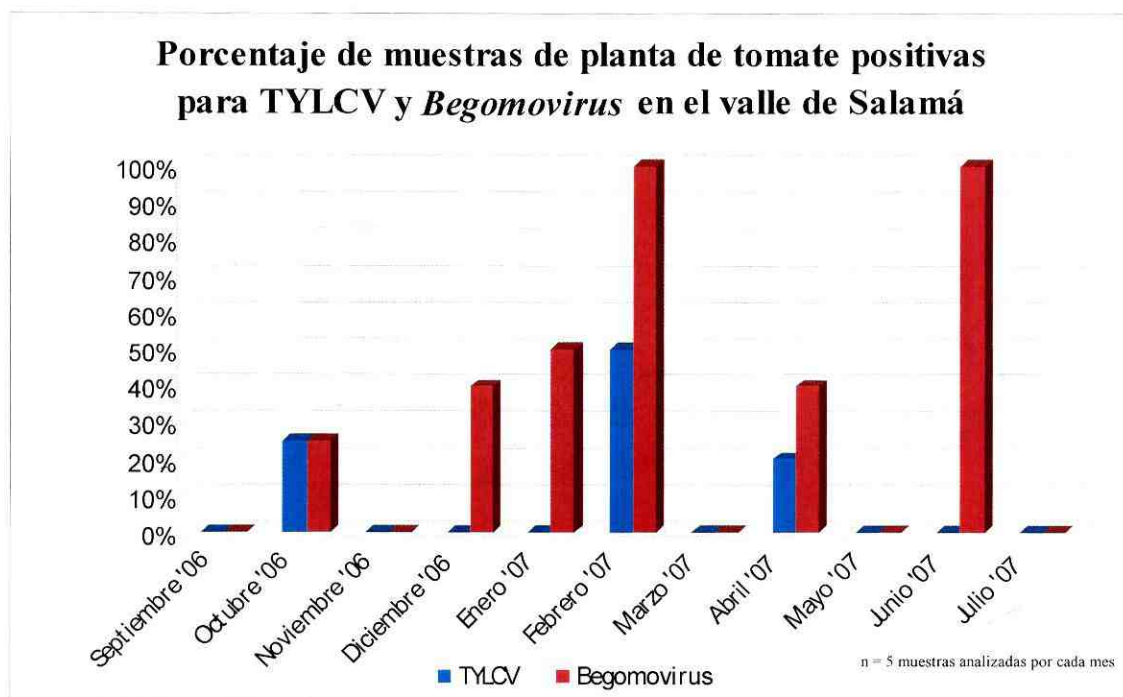
Figura 14. Resultado en porcentajes de muestras de *B. tabaci* positivas para la prueba de PCR para la detección de TYLCV en los valles de Asunción Mita, Sanarate, y Salamá en recolecciones realizadas desde marzo 2006 hasta agosto del 2007 (Véase Apéndice D).



### C. Resultados de muestras de plantas de tomate recolectadas de marzo del 2006 a agosto del 2007.

Según los resultados obtenidos para las muestras de plantas colectadas como parte del proyecto “Proyecto de Apoyo al incremento de la productividad y capacidad comercializadora de los productores asociados a FASAGUA, Fase II programa de manejo de complejo de virosis en los diferentes valles de Guatemala”, en el valle de Salamá, se detectó infección por TYLCV en planta de tomate en el mes de octubre de 2006 (véase Figura 15). Estos resultados confirman los obtenidos por el Dr Robert Gilbertson (Phytophatology Department, UC Davis) quien detectó la presencia del virus en plantas de tomate colectadas en esta región en noviembre de 2006 (Véase Apéndice E).

Figura 15. Resultados en porcentajes de muestras de planta de tomate positivas para la prueba de PCR de TYLCV y *Begomovirus* recolectadas en el valle de Salamá desde septiembre del 2006 hasta julio del 2007.



Como puede observarse en la figura 16, en el valle de Sanarate la primera infección por *Begomovirus* en planta se determinó en la muestra colectada en el mes de noviembre de 2006. Los resultados del valle de Sanarate varían de forma similar a los resultados presentados del valle de Salamá. Durante el mes de junio del 2007 se detecta una muestra de planta de tomate como positiva para la prueba de PCR de TYLCV, lo que presenta una infección de TYLCV durante la época en la cual no se detectó el virus en su vector *B. tabaci* como se menciona anteriormente

Figura 16. Resultados en porcentajes de muestras de planta de tomate positivas para la prueba de PCR de TYLCV y *Begomovirus* recolectadas en el valle de Sanarate desde septiembre del 2006 hasta julio del 2007.

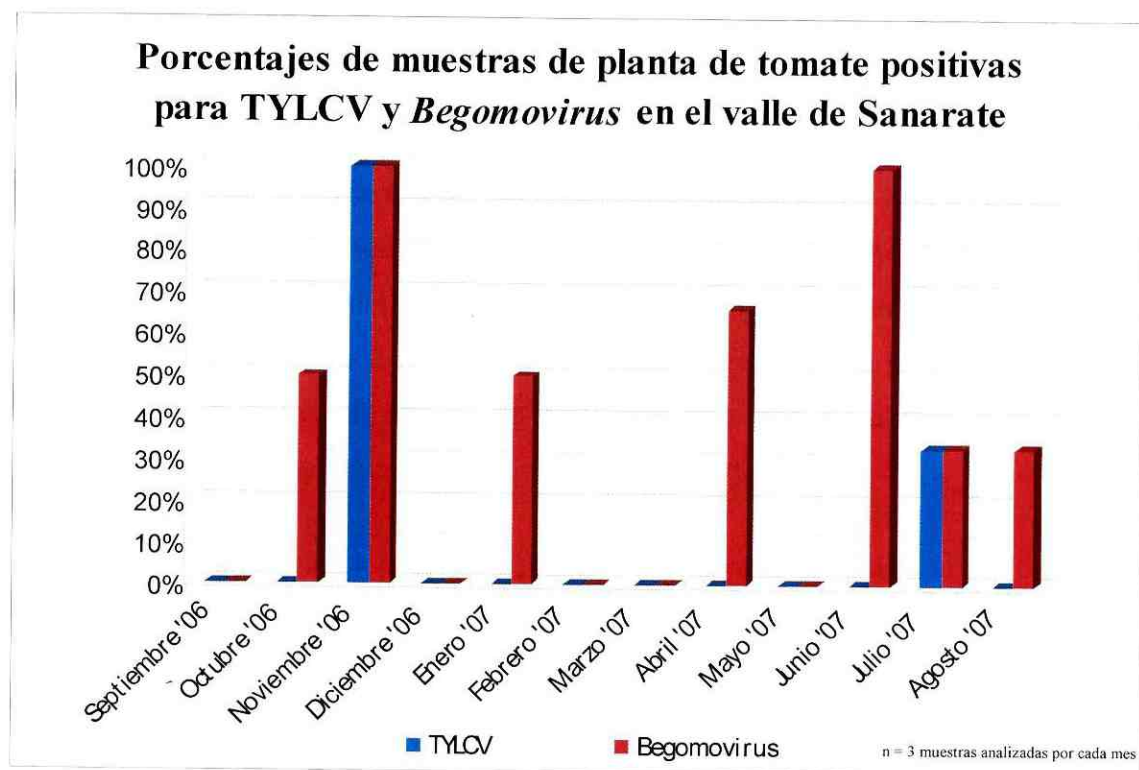


Figura 17. Plantación de tomate en el valle de Sanarate. Utilización de Agribón® en edad temprana del cultivo y con riego por goteo.

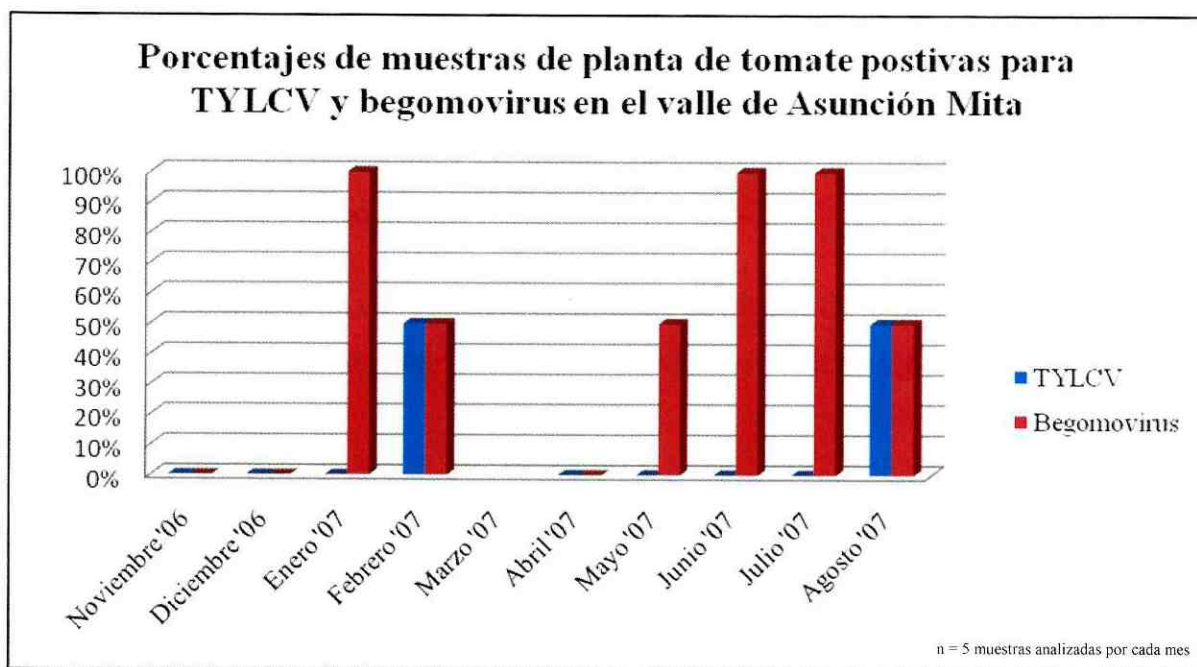


(Estuardo Solares, 2007)

En la Figura 18 se presentan los resultados correspondientes a las plantas colectadas en el valle de Asunción Mita. Según estos resultados puede observarse que la presencia de TYLCV en plantas se detectó inicialmente en las muestras colectadas en febrero de 2007, a pesar de que en su vector se detectó desde marzo de 2006. Esto pudo haber sido afectado por el muestreo de plantas de tomate tan bajo que se realizó en este sector, 2 muestras de plantas de tomate por mes.

Como se observó en los resultados presentados en esta sección, la cronología de los resultados positivos en plantas no concuerda con lo obtenido en las muestras de mosca blanca. Se cree que esto se debe principalmente a las condiciones del muestreo dirigido a plantas ya que éste no es específico para plantas que presenten sintomatología de infección por TYLCV sino que para plantas que presenten la sintomatología asociada a infección por cualquier *Begomovirus*. Para poder confirmar la presencia de TYLCV se realizó una colecta dirigida a plantas de tomate con sintomatología de infección por TYLCV en plantaciones de tomate ubicadas en los valles de Sanarate y Salamá.

Figura 18. Resultados en porcentajes de muestras de planta de tomate para la prueba de PCR de TYLCV y *Begomovirus* recolectadas en el valle de Asunción Mita desde noviembre del 2006 hasta julio del 2007.



#### D. Resultados de plantas de tomate recolectadas el 25 y 26 de septiembre del 2007.

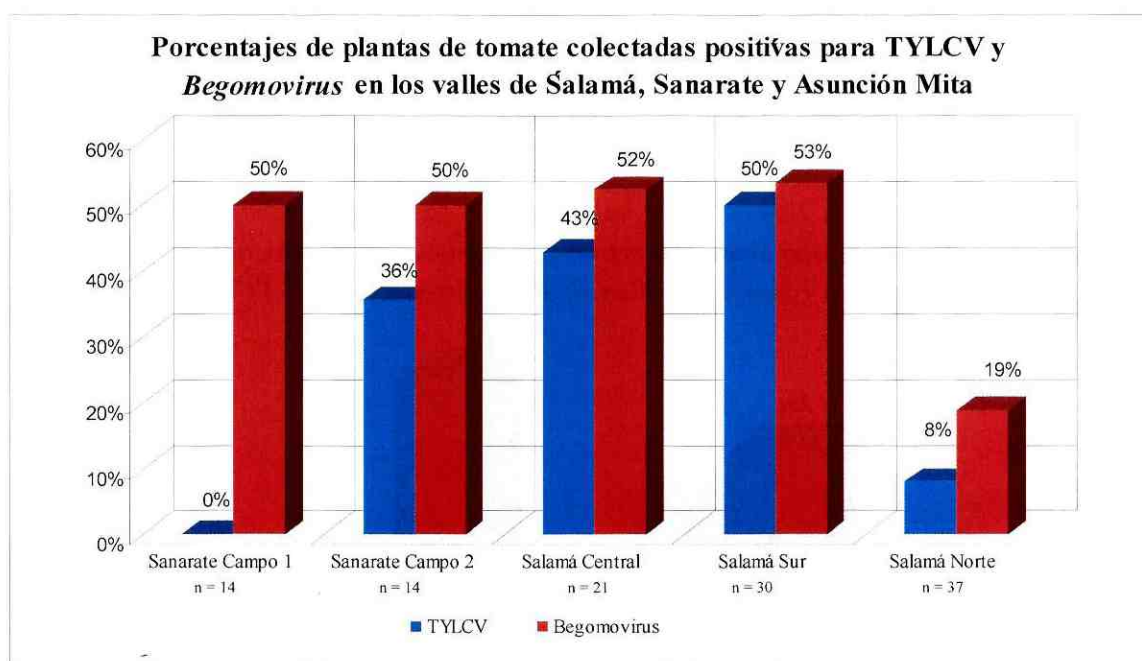
Recordando que el objetivo de nuestra recolecta fue encontrar y verificar muestras de plantas de tomate con infección de TYLCV para control positivo, confirmándolas al extraer el material genético de virus y secuenciarlo (Véase cuadro 8 y apéndices F, I, J y K).

El hecho de encontrar muestras positivas para la prueba de PCR para detección de TYLCV indica la presencia del virus en los cultivos tomateros de la región. En la figura 19 y 20, se observa los resultados en porcentajes de las pruebas de PCR positivas para TYLCV y *Begomovirus* que se aplicaron a muestras de plantas de tomate recolectadas no aleatoriamente el 25 y 26 de septiembre del 2007 en los valles de Salamá y Sanarate.

Los resultados de Sanarate indican la presencia de TYLCV en sólo un sector del valle (Véase figura 19). El sector campo 2 presenta la infección por TYLCV claramente, incluso se relaciona presencia de TYLCV y *Begomovirus* según se observa en la figura 19.

En el Campo 1 sólo se detectó infección por *Begomovirus* pero ninguna muestra resultó ser positiva para la prueba de PCR para la detección de TYLCV. Esto se puede identificar claramente en la figura 19. Los resultados indican la presencia de TYLCV en los distintos sectores productores de tomate de los valles de Salamá y Sanarate a excepción del sector Campo 1.

Figura 19. Comparación de resultados de muestra de plantas de tomate positivas para TYLCV en los distintos sectores de los valles de Salamá y Sanarate.

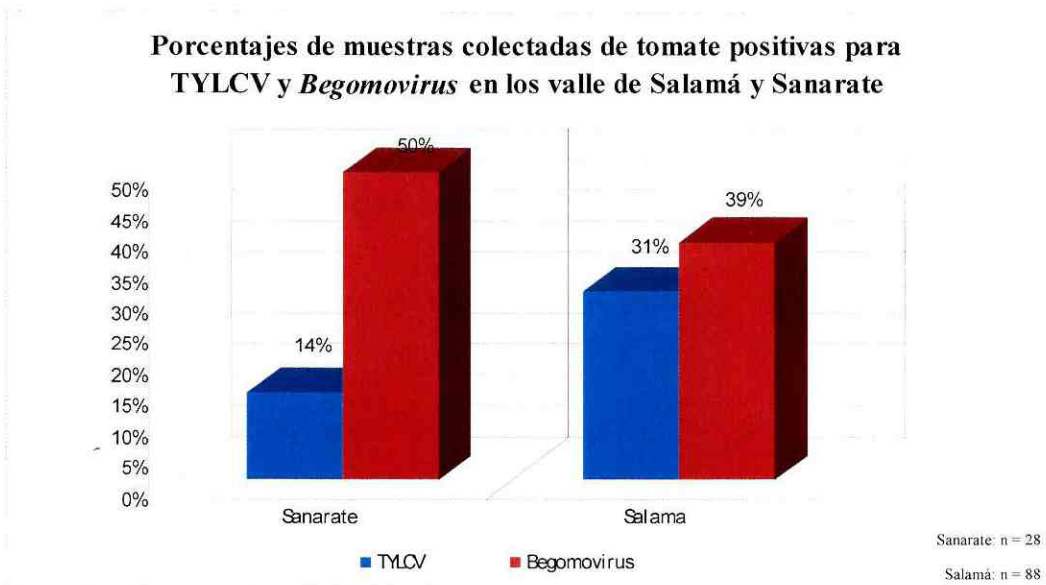


Los resultados en el valle de Salamá sobre la presencia de *Begomovirus* son claros. Estos resultados están fuertemente apoyados por la presencia de TYLCV en las muestras recolectadas. Los porcentajes indican que a la mayoría de las muestras positivas para *Begomovirus* se les detectó TYLCV por PCR. El muestreo se realizó de forma no

aleatoria, recolectando muestras que presentaran síntomas probablemente de TYLCV. Lo anterior indica la existencia de una estrecha relación entre los porcentajes de *Begomovirus* y TYLCV. En la figura 19 se observa el fenómeno de relación entre la presencia de *Begomovirus* y sólo el TYLCV en plantas de tomate, específicamente en el sector de Salamá sur y Salamá central.

Los porcentajes de la comparación entre los valles de Salamá y Sanarate, indican que en los valles existe la presencia de TYLCV (Véase figura 20). Sanarate con una presencia de *Begomovirus* del 50% y 14% de muestras infectadas con TYLCV. Mientras en el valle de Salamá se detectó un 39% de las muestras con infección de *Begomovirus* y 35% resultaron positivas para la prueba de PCR para TYLCV. Esto puede indicar que existe una mayor propagación de TYLCV en el valle de Salamá, se deduce de la comparación de los anteriores valores en la figura 19.

Figura 20. Comparación de porcentajes de muestras de plantas de tomate positivas para TYLCV y *Begomovirus* en los valles de dos valles. Valle de Sanarate y Salamá, 25 y 26 de septiembre del 2007.



Los factores climáticos y de muestreo pudieron afectar la comprobación de TYLCV en esa región. Un factor muy importante que existe entre los dos sectores de Sanarate, es que se encuentran divididos por la carretera interamericana. Esta barrera física puedes ser

uno de los factores que explique la detección del virus sólo en el sector campo 2 del valle de Sanarate. También hay que tomar en cuenta que el manejo de plagas integrado ocurre en el sector campo 1. En la figura 17 se observa la aplicación de Agribon® y el sistema de riego por goteo en cultivos de edad temprana en una plantación del sector Campo 1. Con esto, intentan evitar la infección de *Begomovirus* en las primeras etapas del cultivo.

#### IV. CONCLUSIONES

- La presencia de TYLCV en plantaciones de tomate en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita es un hecho, comprobándose a través de la prueba de PCR. La circulación del TYLCV fue constatada por lo resultados positivos que se obtuvieron en las muestras de *B. tabaci* recolectadas en los distintos valles.
- La prueba de PCR para la identificación de TYLCV en plantas de tomate y *B. tabaci* funciona.
- En el caso del valle de Asunción Mita la presencia de TYLCV se demuestra al inicio de la colecta, en marzo del 2006. Mientras que la circulación de TYLCV en Sanarate se presenta en junio del 2006 al inicio de la colecta en esta localidad también. Por esto, no se puede determinar la fecha de ingreso del TYLCV en las plantaciones de tomate de los valle de Asunción Mita y Sanarate.
- En el caso de Salamá se concluye que el virus se detectó en el vector *B. tabaci* desde el mes de agosto del 2006.
- La detección de infección de TYLCV en plantas de tomate en Salamá se presenta en octubre del 2006, luego en el valle de Sanarate en noviembre del 2006. Por último, se detecta la primera infección de planta de tomate por TYLCV en el valle de Asunción Mita en febrero del 2007.

## V. RECOMENDACIONES

Los resultados indican la necesidad de implementar un monitoreo de TYLCV en los valles de Salamá, Sanarate, Asunción Mita y otros lugares de importancia agrícolas para la producción de tomate. Entre estos figuran el valles de Retana, plantaciones de los departamentos de Chimaltenango, Quiché, Chiquimula, Jutiapa, Retalhuleu y regiones del altiplano.

Se recomienda realizar capacitaciones de manejo integrado de plagas para *B. tabaci* vector del TYLCV. Estas capacitaciones deben ser dirigidas a agricultores y personal que labora en servicios agrícolas.

Se deben realizar estudios de la presencia de TYLCV en plantaciones de otros cultivos como el chile pimiento y determinar sus niveles de infección y síntomas.

Se recomienda realizar una segunda prueba de PCR con otros cebadores. Diseñar cebadores que amplifiquen gran parte del genoma del TYLCV. Secuenciar el TYLCV en cada uno de las muestras reportadas como positivas. De esta manera comprobaremos de forma certera la cepa TYLCV que se esta detectando.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Briddon, RW. y J. Stanley. (2006). **Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses.** *Virology* 344(1):198-210.
- Carabali, A. 2004. **Potencial de resistencia de diferentes genotipos de yuca *Manihot esculenta* Crantz al biotipo B de mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae).** Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Cali, Colombia. 99 pp.
- De La Torre-Almaráz, *et. al.* 2002. **Caracterización de un geminivirus en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la región centro de México.** *Agrociencia* 36:471-481.
- Faria, J. C., R. L. Gilbertson, S. F. Hanson, F. J. Morales, P. Ahlquist, A. O. Loniello y D. P. Maxwell. 1994. **Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequence, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships.** *Phytopathology* 84:321-329.
- Federación de Asociaciones Agrícolas de Guatemala (FASAGUA). 2007. **Programa de monitoreo de mosca blanca.** Disponible en <http://www.fasagua.com/default.php?lng=&showpage=36>.
- Ghanim M y H. Czonesk. 2000. **Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) transmitted along whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related matter.** *Journal of Virology* 74(10):4738-4745.
- Ghanim, M., S. Morin, M. Zeidan y H. Czosnek. 1998. **Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*.** *Journal of Virology* 240(2):295-303.
- ICTVdB Management. 2006. **The Universal Virus Database, version 4.** Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>.
- MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación). 2006. **Tomate y chile guatemalteco.** Disponible en [http://www.maga.gob.gt/maga\\_portal/index.php?option=com\\_content&task=view&id=185](http://www.maga.gob.gt/maga_portal/index.php?option=com_content&task=view&id=185).
- Martínez, J. 2001. **Tomato markets in Central America.** Tomato Breeder's Round Table. Antigua, Guatemala. Disponible en <http://www.oardc.ohio-state.edu/tomato/prgm01.htm>

- Mejía, L. 2006. **Híbridos resistentes para la producción sostenible del tomate.** Informe final. Proyecto AGROCYT 002:2002. Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. Guatemala. 288 pp.
- Mejía, L. 1996. **Enrollamiento de la hoja del tomate el complejo mosca blanca-virus géminis.** Agricultura. Guatemala. 4 pp.
- Mejía, L. y D. Dardón. 1994. **Biología y Manejo del complejo de Mosca blanca y virosis.** Memorias III taller Centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca. Antigua Guatemala. Pp. 109.
- Nakhla, M., A. Sorensen, L. Mejía, P. Ramírez, J. Karkashian y D. Maxwell. 2005. **Molecular characterization of tomato-infecting *Begomoviruses* in Central America and development of DNA-based detection methods.** Acta Hort. 695:277-288.
- Naranjo, S., L. Cañas y P. Ellsworth. 2004. **Mortalidad de *Bemisia tabaci* en un sistema de cultivos múltiples.** Horticultura general 43:14-21.
- Ortiz, L. 2007. **Monitoreo de la incidencia de 4 especies de *Begomovirus* (Geminiviridae) en mosca blanca (*Bemisia tabaci*) recolectadas en 5 valles tomateros de Guatemala, como parte de un programa de manejo integrado de tomate.** Tesis Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 75 pp.
- Palmieri, M., J. Brown., M. Orozco., L. Pineda y L. López. 1999. **Marcadores moleculares para la identificación y monitoreo de la distribución de geminivirus y biotipos de *B. tabaci* en plantaciones del sur y Valle de Motagua, en Guatemala.** FONACYT proyecto No. 21, Informe Final, Guatemala. 137 pp.
- Palmieri, M., R. Gilbertson, A. Ávalos y J. Melgar. 2005. **Monitoreo de la infección por diferentes *Begomovirus* de *B. tabaci*, en campos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), como criterio de alerta para establecer períodos libres de hospederos de *Begomovirus* o períodos adecuados para la siembra de tomate en diferentes regiones del país.** Propuesta de proyecto AGROCYT 031-2005. Sin publicar.
- Polston, J.E. and P.K. Anderson. 1997. **The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere.** Plant Dis. 81:1358-1369.
- Ramírez, P. y D. Maxwell. 1994. ***Geminivirus* transmitidos por moscas blancas.** Memorias del III taller centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca. 95 pp.
- Rivera R. y R. Ruiz. 1997. **Los *Geminivirus*: patógenos de plantas como modelos.** Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. Pp 311-324.

- Rodríguez E. 2003. **Determinación de la infectividad e incidencia de TYLCV en pimiento.** IFAPA CUFA-Almería, Universidad de Almería. España. 8 pp.
- Rojas, M., R. Gilbertson, D. Russell, y D. Maxwell. 1993. **Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses.** Plant Dis. 77:340-347.
- Rosell, R., I. Torres-Jerez y J. Brown. 1999. **Tracing the Geminivirus-Whitefly transmission pathway by polimerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew.** Virology 83:239-246.
- Rubio L., I. Font, C. Jordá, J. Serra, N. Durán, P. Moreno y J. Guerri. 2002. **Incidencia de los virus del rizado amarillo del tomate en cultivos de tomate de la comunidad valenciana, España.** Bol. San. Veg. Plagas 28:599-607.
- Salati, R., M.K. Nahkla, M.R Rojas, P. Guzman, J. Jaquez, D.P. Maxwell, and R.L. Gilbertson. 2002. **Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts.** Phytopathology 92:487-496.
- Serra *et al.* 2006. **Desarrollo epidemiológico de la virosis en la Comunidad Valenciana: el caso del virus de la cuchara del tomate.** Conselleria de Medio Ambiente, Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Servicio de Sanidad Vegetal. España. Pp. 49-53.
- Stanley. J, S. Mansoor, R. Briddon, y Y. Zafar. 2003. **Geminivirus disease complexes: an emerging threat.** Trends in plant sciences 8(3):128-34.
- Sinisterra, X., C. McKenzie, W. Hunter y R. Shatters. 2005. **Differential transcriptional activity of plant pathogenic Begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera: Aleyrodidae).** J. General Virology 86:1525-32.
- Weissensteiner T, A. Griffin y G. Griffin. 2003. **PCR technology.** CRC Press. Technology & Industrial Arts. USA. 416 pp.
- Zar, J. H. 1984. **Biostatistical analysis.** 2<sup>nd</sup> ed. Prentice Hall. USA. 718 pp.
- Zembo. J. 2003. *Eliminación del bromuro de metilo usado en la fumigación de suelos y sustratos en los cultivos de tomate, melón y ornamentales.* UNIDO - Proyecto MP/GUA/02/139/11-51. PÁGINAS????

## VII. APENDICES.

APÉNDICE A. Resultados de PCR de muestras de mosca blanca *B. tabaci* recolectadas desde marzo 2006 a agosto del 2007. Resultado de PCR para *Begomovirus* y TYLCV.

Código de muestra	Lugar	Fecha	<i>Begomovirus</i>	TYLCV
255	Salamá	Marzo 06	Negativo	No hay
256	Salamá	Marzo 06	Positivo	Negativo
257	Salamá	Marzo 06	Positivo	No hay
258	Salamá	Marzo 06	Positivo	No hay
280	Asunción Mita	Marzo 06	Positivo	Positivo
299	Salamá	Abril 06	Positivo	No hay
300	Salamá	Abril 06	Positivo	No hay
301	Salamá	Abril 06	Positivo	No hay
302	Salamá	Abril 06	Positivo	Negativo
308	Asunción Mita	Abril 06	Positivo	Negativo
344	Asunción Mita	Mayo 06	Positivo	Positivo
345	Asunción Mita	Mayo 06	Positivo	Positivo
355	Salamá	Mayo 06	Negativo	No hay
356	Salamá	Mayo 06	Positivo	Negativo
357	Salamá	Mayo 06	NO hay	
384	Asunción Mita	Junio 06	Negativo	
385	Asunción Mita	Junio 06	Positivo	Negativo
395	Salamá	Junio 06	NO hay	
396	Salamá	Junio 06	Positivo	Negativo
397	Salamá	Junio 06	Positivo	Negativo
398	Salamá	Junio 06	Negativo	
399	Salamá	Junio 06	Negativo	
400	Sanarate	Junio 06	Positivo	Negativo
401	Sanarate	Junio 06	Positivo	Negativo
402	Sanarate	Junio 06	Positivo	Positivo
429	Asunción Mita	Julio 06	Positivo	Negativo
430	Asunción Mita	Julio 06	Positivo	Negativo
437	Salamá	Julio 06	Positivo	No hay
438	Salamá	Julio 06	Negativo	
439	Salamá	Julio 06	Positivo	Negativo
440	Salamá	Julio 06	Positivo	Negativo
441	Salamá	Julio 06	Negativo	
442	Sanarate	Julio 06	Negativo	
443	Sanarate	Julio 06	Negativo	
471	Asunción Mita	Julio 06	Positivo	Negativo
472	Asunción Mita	Julio 06	Positivo	Negativo
477	Salamá	Julio 06	Negativo	
478	Salamá	Julio 06	Positivo	Negativo
480	Salamá	Julio 06	Positivo	Negativo
481	Sanarate	Julio 06	Negativo	
479	Salamá	Julio 06	Positivo	Negativo

<b>Código de muestra</b>	<b>Lugar</b>	<b>Fecha</b>	<b>Begomovirus</b>	<b>TYLCV</b>
482	Sanarate	Julio 06	Negativo	
483	Sanarate	Julio 06	Negativo	
507	Asunción Mita	Agosto 06	Positivo	Negativo
508	Asunción Mita	Agosto 06	Positivo	Negativo
513	Salamá	Agosto 06	Positivo	Negativo
514	Salamá	Agosto 06	Positivo	Positivo
515	Salamá	Agosto 06	Positivo	No hay
516	Salamá	Agosto 06	Positivo	Negativo
517	Salamá	Agosto 06	Positivo	No hay
518	Sanarate	Agosto 06	Positivo	Negativo
519	Sanarate	Agosto 06	Positivo	Negativo
520	Sanarate	Agosto 06	Positivo	Positivo
551	Asunción Mita	Septiembre 06	Positivo	Positivo
552	Asunción Mita	Septiembre 06	Positivo	Positivo
557	Salamá	Septiembre 06	Positivo	Positivo
558	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
559	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
560	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
561	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
564	Sanarate	Septiembre 06	Positivo	Positivo
565	Sanarate	Septiembre 06	Positivo	Positivo
566	Sanarate	Septiembre 06	NO hay	
607	Asunción Mita	Octubre 06	Positivo	Negativo
608	Asunción Mita	Octubre 06	Positivo	Positivo
616	Salamá	Octubre 06	NO hay	
617	Salamá	Octubre 06	NO hay	
618	Salamá	Octubre 06	NO hay	
619	Salamá	Octubre 06	Positivo	Positivo
620	Salamá	Octubre 06	Positivo	Positivo
624	Sanarate	Octubre 06	NO hay	
625	Sanarate	Octubre 06	Positivo	Negativo
626	Sanarate	Octubre 06	NO hay	
670	Asunción Mita	Noviembre 06	Positivo	Positivo
671	Asunción Mita	Noviembre 06	Positivo	Positivo
676	Salamá	Noviembre 06	Positivo	Positivo
677	Salamá	Noviembre 06	Positivo	Positivo
678	Salamá	Noviembre 06	Positivo	Positivo
679	Salamá	Noviembre 06	Negativo	
680	Salamá	Noviembre 06	Positivo	Negativo
681	Salamá	Noviembre 06	NO hay	
682	Salamá	Noviembre 06	Negativo	
687	Sanarate	Noviembre 06	Negativo	
688	Sanarate	Noviembre 06	NO hay	
689	Sanarate	Noviembre 06	Negativo	
733	Asunción Mita	Diciembre 06	Positivo	Positivo
734	Asunción Mita	Diciembre 06	Positivo	Negativo
740	Salamá	Diciembre 06	Positivo	Positivo

Código de muestra	Lugar	Fecha	<i>Begomovirus</i>	TYLCV
255	Salamá	Marzo 06	Negativo	No hay
256	Salamá	Marzo 06	Positivo	Negativo
257	Salamá	Marzo 06	Positivo	No hay
258	Salamá	Marzo 06	Positivo	No hay
280	Asunción Mita	Marzo 06	Positivo	Positivo
299	Salamá	Abril 06	Positivo	No hay
300	Salamá	Abril 06	Positivo	No hay
301	Salamá	Abril 06	Positivo	No hay
302	Salamá	Abril 06	Positivo	Negativo
308	Asunción Mita	Abril 06	Positivo	Negativo
344	Asunción Mita	Mayo 06	Positivo	Positivo
345	Asunción Mita	Mayo 06	Positivo	Positivo
355	Salamá	Mayo 06	Negativo	No hay
356	Salamá	Mayo 06	Positivo	Negativo
357	Salamá	Mayo 06	NO hay	
384	Asunción Mita	Junio 06	Negativo	
385	Asunción Mita	Junio 06	Positivo	Negativo
395	Salamá	Junio 06	NO hay	
396	Salamá	Junio 06	Positivo	Negativo
397	Salamá	Junio 06	Positivo	Negativo
398	Salamá	Junio 06	Negativo	
399	Salamá	Junio 06	Negativo	
400	Sanarate	Junio 06	Positivo	Negativo
401	Sanarate	Junio 06	Positivo	Negativo
402	Sanarate	Junio 06	Positivo	Positivo
429	Asunción Mita	Julio 06	Positivo	Negativo
430	Asunción Mita	Julio 06	Positivo	Negativo
437	Salamá	Julio 06	Positivo	No hay
438	Salamá	Julio 06	Negativo	
439	Salamá	Julio 06	Positivo	Negativo
440	Salamá	Julio 06	Positivo	Negativo
441	Salamá	Julio 06	Negativo	
442	Sanarate	Julio 06	Negativo	
443	Sanarate	Julio 06	Negativo	
471	Asunción Mita	Julio 06	Positivo	Negativo
472	Asunción Mita	Julio 06	Positivo	Negativo
477	Salamá	Julio 06	Negativo	
478	Salamá	Julio 06	Positivo	Negativo
480	Salamá	Julio 06	Positivo	Negativo
481	Sanarate	Julio 06	Negativo	
479	Salamá	Julio 06	Positivo	Negativo
482	Sanarate	Julio 06	Negativo	
483	Sanarate	Julio 06	Negativo	
507	Asunción Mita	Agosto 06	Positivo	Negativo
508	Asunción Mita	Agosto 06	Positivo	Negativo
513	Salamá	Agosto 06	Positivo	Negativo
514	Salamá	Agosto 06	Positivo	Positivo

<b>Código de muestra</b>	<b>Lugar</b>	<b>Fecha</b>	<b><i>Begomovirus</i></b>	<b>TYLCV</b>
515	Salamá	Agosto 06	Positivo	No hay
516	Salamá	Agosto 06	Positivo	Negativo
517	Salamá	Agosto 06	Positivo	No hay
518	Sanarate	Agosto 06	Positivo	Negativo
519	Sanarate	Agosto 06	Positivo	Negativo
520	Sanarate	Agosto 06	Positivo	Positivo
551	Asunción Mita	Septiembre 06	Positivo	Positivo
552	Asunción Mita	Septiembre 06	Positivo	Positivo
557	Salamá	Septiembre 06	Positivo	Positivo
558	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
559	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
560	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
561	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
564	Sanarate	Septiembre 06	Positivo	Positivo
565	Sanarate	Septiembre 06	Positivo	Positivo
566	Sanarate	Septiembre 06	NO hay	
607	Asunción Mita	Octubre 06	Positivo	Negativo
608	Asunción Mita	Octubre 06	Positivo	Positivo
616	Salamá	Octubre 06	NO hay	
617	Salamá	Octubre 06	NO hay	
618	Salamá	Octubre 06	NO hay	
619	Salamá	Octubre 06	Positivo	Positivo
620	Salamá	Octubre 06	Positivo	Positivo
624	Sanarate	Octubre 06	NO hay	
625	Sanarate	Octubre 06	Positivo	Negativo
626	Sanarate	Octubre 06	NO hay	
670	Asunción Mita	Noviembre 06	Positivo	Positivo
671	Asunción Mita	Noviembre 06	Positivo	Positivo
676	Salamá	Noviembre 06	Positivo	Positivo
677	Salamá	Noviembre 06	Positivo	Positivo
678	Salamá	Noviembre 06	Positivo	Positivo
679	Salamá	Noviembre 06	Negativo	
680	Salamá	Noviembre 06	Positivo	Negativo
681	Salamá	Noviembre 06	NO hay	
682	Salamá	Noviembre 06	Negativo	
687	Sanarate	Noviembre 06	Negativo	
688	Sanarate	Noviembre 06	NO hay	
689	Sanarate	Noviembre 06	Negativo	
733	Asunción Mita	Diciembre 06	Positivo	Positivo
734	Asunción Mita	Diciembre 06	Positivo	Negativo
740	Salamá	Diciembre 06	Positivo	Positivo
741	Salamá	Diciembre 06	Positivo	Positivo
742	Salamá	Diciembre 06	Positivo	Positivo
743	Salamá	Diciembre 06	Positivo	Positivo
744	Salamá	Diciembre 06	Positivo	Positivo
750	Sanarate	Diciembre 06	Positivo	Negativo
751	Sanarate	Diciembre 06	Positivo	Positivo

<b>Código de muestra</b>	<b>Lugar</b>	<b>Fecha</b>	<b>Begomovirus</b>	<b>TYLCV</b>
752	Sanarate	Diciembre 06	Positivo	Positivo
789	Asunción Mita	Enero 07	Positivo	Positivo
790	Asunción Mita	Enero 07	Positivo	Positivo
801	Salamá	Enero 07	Positivo	Positivo
802	Salamá	Enero 07	NO hay	
803	Salamá	Enero 07	Positivo	Positivo
804	Salamá	Enero 07	Positivo	Positivo
805	Salamá	Enero 07	Positivo	Positivo
806	Salamá	Enero 07	Positivo	Positivo
813	Sanarate	Enero 07	NO hay	
814	Sanarate	Enero 07	Negativo	
815	Sanarate	Enero 07	NO hay	
862	Asunción Mita	Febrero 07	Positivo	Negativo
863	Asunción Mita	Febrero 07	Positivo	Negativo
869	Salamá	Febrero 07	Negativo	
870	Salamá	Febrero 07	Positivo	Positivo
871	Salamá	Febrero 07	Positivo	Positivo
872	Salamá	Febrero 07	Positivo	Positivo
873	Salamá	Febrero 07	Positivo	Positivo
880	Sanarate	Febrero 07	NO hay	
881	Sanarate	Febrero 07	NO hay	
882	Sanarate	Febrero 07	Positivo	Negativo
915	Salamá	Marzo 07	Positivo	Negativo
916	Salamá	Marzo 07	NO hay	
917	Salamá	Marzo 07	Positivo	Negativo
918	Salamá	Marzo 07	Positivo	Negativo
919	Salamá	Marzo 07	Positivo	Positivo
920	Salamá	Marzo 07	Positivo	Positivo
928	Sanarate	Marzo 07	Positivo	Positivo
929	Sanarate	Marzo 07	Negativo	
930	Sanarate	Marzo 07	Positivo	Positivo
944	Asunción Mita	Abril 07	Positivo	Negativo
945	Asunción Mita	Abril 07	Positivo	Negativo
981	Salamá	Abril 07	Positivo	Positivo
982	Salamá	Abril 07	Positivo	Positivo
983	Salamá	Abril 07	Positivo	Positivo
984	Salamá	Abril 07	Positivo	Positivo
985	Salamá	Abril 07	Positivo	Negativo
992	Sanarate	Abril 07	Positivo	Positivo
993	Sanarate	Abril 07	Positivo	Negativo
994	Sanarate	Abril 07	NO hay	
1009	Asunción Mita	Mayo 07	Positivo	Positivo
1010	Asunción Mita	Mayo 07	Positivo	Negativo
1039	Sanarate	Mayo 07	Positivo	Positivo
1040	Sanarate	Mayo 07	Positivo	Positivo
1041	Sanarate	Mayo 07	Positivo	Negativo
1043	Salamá	Mayo 07	Positivo	Positivo

<b>Código de muestra</b>	<b>Lugar</b>	<b>Fecha</b>	<b>Begomovirus</b>	<b>TYLCV</b>
1044	Salamá	Mayo 07	Positivo	Positivo
1045	Salamá	Mayo 07	Positivo	Positivo
1046	Salamá	Mayo 07	Positivo	Positivo
1047	Salamá	Mayo 07	Positivo	Positivo
1065	Asunción Mita	Junio 07	Positivo	Positivo
1066	Asunción Mita	Junio 07	Positivo	Positivo
1093	Salamá	Junio 07	Positivo	Positivo
1094	Salamá	Junio 07	Positivo	Positivo
1095	Salamá	Junio 07	Positivo	Positivo
1096	Salamá	Junio 07	Positivo	Positivo
1097	Salamá	Junio 07	NO hay	
1102	Sanarate	Junio 07	NO hay	
1103	Sanarate	Junio 07	Positivo	Negativo
1104	Sanarate	Junio 07	Positivo	Negativo
1128	Asunción Mita	Julio 07	Positivo	Negativo
1129	Asunción Mita	Julio 07	Positivo	Positivo
1162	Salamá	Julio 07	Negativo	
1163	Salamá	Julio 07	Positivo	Positivo
1164	Salamá	Julio 07	Positivo	Positivo
1165	Salamá	Julio 07	Positivo	Positivo
1166	Salamá	Julio 07	Positivo	Positivo
1167	Sanarate	Julio 07	Positivo	Negativo
1168	Sanarate	Julio 07	Positivo	Negativo
1169	Sanarate	Julio 07	Positivo	Negativo
1183	Asunción Mita	Agosto 07	Positivo	Negativo
1184	Asunción Mita	Agosto 07	Positivo	Negativo
1211	Salamá	Agosto 07	Negativo	
1212	Salamá	Agosto 07	Negativo	
1213	Salamá	Agosto 07	Positivo	Positivo
1214	Salamá	Agosto 07	NO hay	
1215	Salamá	Agosto 07	NO hay	
1216	Sanarate	Agosto 07	Positivo	Negativo
1217	Sanarate	Agosto 07	Negativo	
1218	Sanarate	Agosto 07	Positivo	Negativo
1270	Salamá	Septiembre 07	Negativo	
1271	Salamá	Septiembre 07	Positivo	Negativo
1272	Salamá	Septiembre 07	no hay	
1273	Salamá	Septiembre 07	Positivo	Negativo
1274	Salamá	Septiembre 07	Positivo	Negativo
1275	Sanarate	Septiembre 07	Positivo	Negativo
1276	Sanarate	Septiembre 07	Negativo	

APÉNDICE B. Resultados de PCR de muestras de plantas de tomate recolectadas desde Marzo 2006 hasta Agosto del 2007. Resultado de la prueba de PCR para *Begomovirus* y TYLCV.

Código de muestra	Lugar	Fecha	<i>Begomovirus</i>	TYLCV
300	Asunción Mita	Septiembre 06	No hay	
301	Asunción Mita	Septiembre 06	No hay	
306	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
307	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
308	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
309	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
310	Salamá	Septiembre 06	Negativo	
316	Sanarate	Septiembre 06	Negativo	
317	Sanarate	Septiembre 06	Negativo	
318	Sanarate	Septiembre 06	No hay	
361	Asunción Mita	Octubre 06	No hay	
362	Asunción Mita	Octubre 06	No hay	
367	Salamá	Octubre 06	No hay	
368	Salamá	Octubre 06	Negativo	
369	Salamá	Octubre 06	Positivo	Positivo
370	Salamá	Octubre 06	Negativo	
371	Salamá	Octubre 06	Negativo	
378	Sanarate	Octubre 06	No hay	
379	Sanarate	Octubre 06	Positivo	Negativo
380	Sanarate	Octubre 06	Negativo	
424	Asunción Mita	Noviembre 06	Negativo	
425	Asunción Mita	Noviembre 06	Negativo	
430	Salamá	Noviembre 06	No hay	
431	Salamá	Noviembre 06	No hay	
432	Salamá	Noviembre 06	Negativo	Negativo
433	Salamá	Noviembre 06	Negativo	Negativo
434	Salamá	Noviembre 06	Negativo	Negativo
435	Salamá	Noviembre 06	Negativo	
436	Salamá	Noviembre 06	No hay	
442	Sanarate	Noviembre 06	No hay	
443	Sanarate	Noviembre 06	No hay	
444	Sanarate	Noviembre 06	Positivo	Positivo
488	Asunción Mita	Diciembre 06	Negativo	
489	Asunción Mita	Diciembre 06	Negativo	
495	Salamá	Diciembre 06	Negativo	
496	Salamá	Diciembre 06	Negativo	
497	Salamá	Diciembre 06	Negativo	
498	Salamá	Diciembre 06	positivo	Negativo
499	Salamá	Diciembre 06	positivo	Negativo
506	Sanarate	Diciembre 06	Negativo	
507	Sanarate	Diciembre 06	Negativo	
508	Sanarate	Diciembre 06	Negativo	
545	Asunción Mita	Enero 07	Positivo	Negativo

<b>Código de muestra</b>	<b>Lugar</b>	<b>Fecha</b>	<b><i>Begomovirus</i></b>	<b>TYLCV</b>
546	Asunción Mita	Enero 07	No hay	
557	Salamá	Enero 07	Negativo	
558	Salamá	Enero 07	No hay	
559	Salamá	Enero 07	No hay	
560	Salamá	Enero 07	No hay	
561	Salamá	Enero 07	No hay	
562	Salamá	Enero 07	Positivo	Negativo
569	Sanarate	Enero 07	No hay	
570	Sanarate	Enero 07	Positivo	Negativo
571	Sanarate	Enero 07	Negativo	
618	Asunción Mita	Febrero 07	Positivo	Positivo
619	Asunción Mita	Febrero 07	Negativo	
625	Salamá	Febrero 07	No hay	
626	Salamá	Febrero 07	Positivo	Positivo
627	Salamá	Febrero 07	Positivo	Negativo
628	Salamá	Febrero 07	no hay	
629	Salamá	Febrero 07	No hay	
636	Sanarate	Febrero 07	Negativo	
637	Sanarate	Febrero 07	Negativo	
638	Sanarate	Febrero 07	Negativo	
675	Salamá	Marzo 07	Negativo	
676	Salamá	Marzo 07	No hay	
677	Salamá	Marzo 07	No hay	
678	Salamá	Marzo 07	No hay	
679	Salamá	Marzo 07	Negativo	Negativo
680	Salamá	Marzo 07	No hay	
687	Sanarate	Marzo 07	Negativo	Negativo
688	Sanarate	Marzo 07	Negativo	
689	Sanarate	Marzo 07	Negativo	
703	Asunción Mita	Abril 07	Negativo	
704	Asunción Mita	Abril 07	Negativo	Negativo
740	Salamá	Abril 07	Negativo	
741	Salamá	Abril 07	Negativo	
742	Salamá	Abril 07	Negativo	
743	Salamá	Abril 07	Positivo	Negativo
744	Salamá	Abril 07	positivo	Positivo
751	Sanarate	Abril 07	Positivo	Negativo
752	Sanarate	Abril 07	Negativo	
753	Sanarate	Abril 07	Positivo	Negativo
768	Asunción Mita	Mayo 07	Negativo	
769	Asunción Mita	Mayo 07	Positivo	Negativo
798	Sanarate	Mayo 07	Negativo	
799	Sanarate	Mayo 07	Negativo	
800	Sanarate	Mayo 07	No hay	
802	Salamá	Mayo 07	Negativo	
803	Salamá	Mayo 07	Negativo	
804	Salamá	Mayo 07	Negativo	

<b>Código de muestra</b>	<b>Lugar</b>	<b>Fecha</b>	<b><i>Begomovirus</i></b>	<b>TYLCV</b>
805	Salamá	Mayo 07	Negativo	
806	Salamá	Mayo 07	Negativo	
824	Asunción Mita	Junio 07	Positivo	Negativo
825	Asunción Mita	Junio 07	Positivo	Negativo
852	Salamá	Junio 07	Positivo	Negativo
853	Salamá	Junio 07	Positivo	Negativo
854	Salamá	Junio 07	Positivo	Negativo
855	Salamá	Junio 07	Positivo	Negativo
856	Salamá	Junio 07	Positivo	Negativo
861	Sanarate	Junio 07	No hay	
862	Sanarate	Junio 07	No hay	
863	Sanarate	Junio 07	Positivo	Negativo
878	Asunción Mita	Julio 07	Positivo	Negativo
879	Asunción Mita	Julio 07	Positivo	Negativo
910	Salamá	Julio 07	No hay	
911	Salamá	Julio 07	Negativo	
912	Salamá	Julio 07	No hay	
913	Salamá	Julio 07	No hay	
914	Salamá	Julio 07	No hay	
915	Sanarate	Julio 07	Negativo	
916	Sanarate	Julio 07	Negativo	
917	Sanarate	Julio 07	Positivo	Positivo
931	Asunción Mita	Agosto 07	Positivo	Positivo
932	Asunción Mita	Agosto 07	Negativo	
963	Salamá	Agosto 07	No hay	
964	Salamá	Agosto 07	No hay	
965	Salamá	Agosto 07	No hay	
966	Salamá	Agosto 07	No hay	
967	Salamá	Agosto 07	No hay	
968	Sanarate	Agosto 07	Negativo	
969	Sanarate	Agosto 07	Positivo	Negativo
970	Sanarate	Agosto 07	Negativo	

APÉNDICE C. Resultados de PCR de muestras de plantas de tomate recolectadas el 25 y 26 de Septiembre del 2007 en los valles de Sanarate y Salamá.

Código de muestra	Lugar	Sector	<i>Begomovirus</i>	TYLCV
1	Sanarate	Campo 1	Negativo	
2	Sanarate	Campo 1	Negativo	
3	Sanarate	Campo 1	Negativo	
4	Sanarate	Campo 1	Negativo	
5	Sanarate	Campo 1	Negativo	
6	Sanarate	Campo 1	Positivo	Negativo
7	Sanarate	Campo 1	Negativo	
8	Sanarate	Campo 1	Positivo	Negativo
9	Sanarate	Campo 1	Positivo	Negativo
10	Sanarate	Campo 1	Negativo	
11	Sanarate	Campo 1	Positivo	Negativo
12	Sanarate	Campo 1	Positivo	Negativo
13	Sanarate	Campo 1	Negativo	
14	Sanarate	Campo 1	Negativo	
15	Sanarate	Campo 1	Negativo	
16	Sanarate	Campo 1	Negativo	
17	Sanarate	Campo 1	Positivo	Negativo
18	Sanarate	Campo 1	Positivo	Negativo
19	Sanarate	Campo 2	Negativo	
20	Sanarate	Campo 2	Negativo	
21	Sanarate	Campo 2	Positivo	Positivo
22	Sanarate	Campo 2	Negativo	
23	Sanarate	Campo 2	Negativo	
24	Sanarate	Campo 2	Positivo	Positivo
25	Sanarate	Campo 2	Negativo	
26	Sanarate	Campo 2	Negativo	
27	Sanarate	Campo 2	Positivo	Negativo
28	Sanarate	Campo 2	Negativo	
29	Sanarate	Campo 2	Positivo	Positivo
30	Sanarate	Campo 2	Positivo	Negativo
31	Sanarate	Campo 2	Positivo	Negativo
32	Sanarate	Campo 2	Positivo	Positivo
33	Salamá	Central	Negativo	
34	Salamá	Central	Positivo	Positivo
35	Salamá	Central	Negativo	
36	Salamá	Central	Positivo	Positivo
37a	Salamá	Central	Positivo	Positivo
37b	Salamá	Central	Positivo	Positivo
38a	Salamá	Central	Positivo	Positivo
38b	Salamá	Central	Positivo	Positivo
39a	Salamá	Central	Positivo	Positivo
39b	Salamá	Central	Positivo	Positivo
40a	Salamá	Central	Negativo	
40b	Salamá	Central	Negativo	

<b>Código de muestra</b>	<b>Lugar</b>	<b>Sector</b>	<b><i>Begomovirus</i></b>	<b>TYLCV</b>
41	Salamá	Central	Negativo	
42	Salamá	Central	Positivo	Negativo
43a	Salamá	Central	Negativo	
43b	Salamá	Central	Negativo	
43c	Salamá	Central	Positivo	Positivo
44a	Salamá	Central	Negativo	
44b	Salamá	Central	Negativo	
45a	Salamá	Central	Negativo	
45b	Salamá	Central	Positivo	
46	Salamá	Norte	Negativo	
47	Salamá	Norte	Negativo	
48	Salamá	Norte	Positivo	Negativo
49	Salamá	Norte	Positivo	Negativo
50	Salamá	Norte	Negativo	
51	Salamá	Norte	Negativo	
52	Salamá	Norte	Negativo	
53	Salamá	Norte	Negativo	
54	Salamá	Norte	Negativo	
55	Salamá	Norte	Negativo	
56	Salamá	Norte	Positivo	Positivo
57	Salamá	Norte	Negativo	
58	Salamá	Norte	Negativo	
59	Salamá	Norte	Negativo	
60	Salamá	Norte	Negativo	
61	Salamá	Norte	Positivo	Positivo
62a	Salamá	Norte	Negativo	
62b	Salamá	Norte	Negativo	
62c	Salamá	Norte	Negativo	
63	Salamá	Norte	Negativo	
64	Salamá	Norte	Negativo	
65	Salamá	Norte	Negativo	
66	Salamá	Norte	Negativo	
67	Salamá	Norte	Positivo	Positivo
68	Salamá	Norte	Negativo	
69	Salamá	Norte	Negativo	
70	Salamá	Norte	Negativo	
71	Salamá	Norte	Negativo	
72	Salamá	Norte	Negativo	
73	Salamá	Norte	Negativo	
74	Salamá	Norte	Negativo	
75a	Salamá	Norte	Negativo	
75b	Salamá	Norte	Negativo	
76	Salamá	Norte	Negativo	
77	Salamá	Norte	Positivo	Negativo
78	Salamá	Norte	Negativo	
79	Salamá	Norte	Positivo	Negativo
80	Salamá	Sur	Positivo	Positivo

<b>Código de muestra</b>	<b>Lugar</b>	<b>Sector</b>	<b><i>Begomovirus</i></b>	<b>TYLCV</b>
81	Salamá	Sur	Negativo	
82	Salamá	Sur	Negativo	
83	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
84	Salamá	Sur	Negativo	
85	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
86	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
87	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
88	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
89	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
90.1	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
90.2	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
90.3	Salamá	Sur	Negativo	
90.4	Salamá	Sur	Negativo	
90.5	Salamá	Sur	Negativo	
90.6	Salamá	Sur	Negativo	
90.7	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
90.8	Salamá	Sur	Negativo	
90.9	Salamá	Sur	Positivo	Negativo
91	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
92	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
93	Salamá	Sur	Negativo	
94a	Salamá	Sur	Negativo	
94b	Salamá	Sur	Negativo	
95	Salamá	Sur	Negativo	
96	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
97	Salamá	Sur	Negativo	
98	Salamá	Sur	Negativo	
99a	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
99b	Salamá	Sur	Positivo	Positivo
100	Salamá (Chile pimiento)	Norte	Positivo	Positivo

APENDICE D. Tabla de resultados en porcentajes de las muestras positivas de mosca blanca *B. tabaci* para la prueba de PCR de detección del subgrupo Begomovirus y de TYLCV en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita. Período de marzo del 2006 hasta septiembre del 2007.

	Asunción Mita		Salamá		Sanarate	
	TYLCV	<i>Begomovirus</i>	TYLCV	<i>Begomovirus</i>	TYLCV	<i>Begomovirus</i>
Marzo '06	100%	100%	0%	100%	--	--
Abril '06	0%	100%	0%	100%	--	--
Mayo '06	100%	100%	0%	50%	--	--
Junio '06	0%	50%	0%	50%	33%	100%
Julio '06	0%	100%	0%	66%	0%	0%
Agosto '06	0%	100%	33%	100%	33%	100%
Septiembre '06	100%	100%	20%	20%	100%	100%
Octubre '06	100%	100%	100%	100%	0%	100%
Noviembre '06	100%	100%	40%	60%	0%	0%
Diciembre '06	50%	100%	100%	100%	66%	100%
Enero '07	100%	100%	100%	100%	0%	0%
Febrero '07	100%	100%	80%	80%	0%	33%
Marzo '07	--	--	20%	100%	66%	66%
Abril '07	0%	100%	80%	100%	50%	100%
Mayo '07	50%	100%	100%	100%	66%	100%
Junio '07	100%	100%	100%	100%	0%	100%
Julio '07	50%	100%	80%	80%	0%	100%
Agosto '07	100%	100%	33%	33%	0%	66%
Septiembre '07	--	--	0%	100%	0%	100%

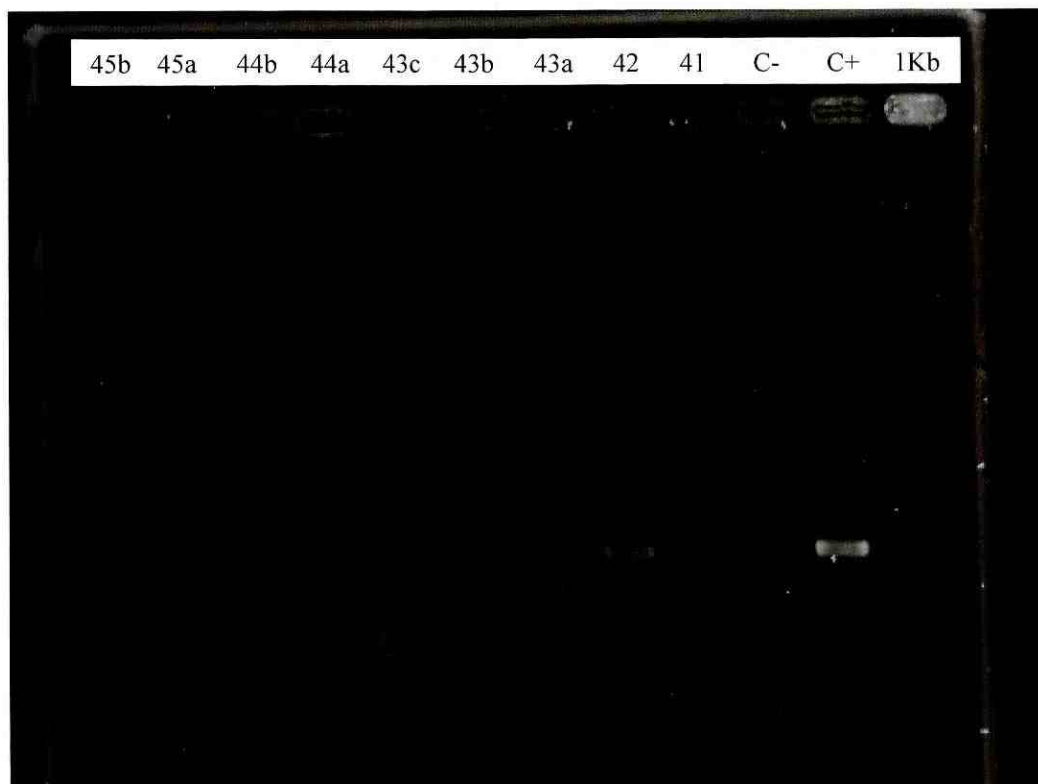
APÉNDICE E. Tabla de resultados en porcentajes de las muestras positivas de plantas de tomate para la prueba de PCR de detección del subgrupo *Begomovirus* y de TYLCV en los valles de Salamá, Sanarate y Asunción Mita. Período de marzo del 2006 hasta septiembre del 2007.

	Asunción Mita		Salamá		Sanarate	
	TYLCV	<i>Begomovirus</i>	TYLCV	<i>Begomovirus</i>	TYLCV	<i>Begomovirus</i>
Septiembre '06			0%	0%	0%	0%
Octubre '06			25%	25%	0%	50%
Noviembre '06	0%	0%	0%	0%	100%	100%
Diciembre '06	0%	0%	0%	40%	0%	0%
Enero '07	0%	100%	0%	50%	0%	50%
Febrero '07	50%	50%	50%	100%	0%	0%
Marzo '07			0%	0%	0%	0%
Abril '07	0%	0%	20%	40%	0%	66%
Mayo '07	0%	50%	0%	0%	0%	0%
Junio '07	0%	100%	0%	100%	0%	100%
Julio '07	0%	100%	0%	0%	33%	33%
Agosto '07	50%	50%			0%	33%

APÉNDICE F. Tabla de resultados en porcentajes de las muestras positivas de plantas de tomate para la prueba de PCR de detección del subgrupo *Begomovirus* y de TYLCV en los valles de Salamá y Sanarate. Recolecta el 25 y 26 de septiembre del 2007.

Por valle	% de muestras positivas	
	<i>Begomovirus</i>	TYLCV
Sanarate	50%	14%
Salamá	39%	31%
Por sector		
Sanarate campo 1	50%	0%
Sanarate campo 2	50%	36%
Salamá Central	52%	43%
Salamá Sur	53%	50%
Salamá Norte	19%	8%

APÉNDICE G. Ejemplo de visualización de gel de agarosa con migración de productos de amplificación de *Begomovirus*. Pozos señalados con el código de las muestra asignados a las plantas de la recolecta del 25 de septiembre. Marcador molecular de 1 Kilo base marca Promega. Control positivo es ADN viral de muestra 91. Muestras positivas son 45b, 43c y 42.





Query	329	GCCAGGATATATCGTACGTATAGAAGCCCAGATGTGCCTAGAGGATGTGAAGGGCCATG	388
Sbjct	348	GCCAGTATATATCGTACGTATAGAAGCCCAGATGTGCCTAGASSATGTGAAGGGCCATG	407
Query	389	TAAGGTCCAGTCCTTCGAGCAGCGGCATGATATCTCGCATGTTGGCAAGGTCATGTGCAT	448
Sbjct	408	TAAGGTCCAGTCCTTCGAGCAGCGGCATGATATCTCGCATGTTGGCAAGGTCATGTGCAT	467
Query	449	TTCGGACGTGACACGTGGTAATGGTATTACTCATCGTGTAGGCAAGCGTTTCTGCGTCAA	508
Sbjct	468	TTCTGACGTGACACGTGGTAATGGTATTACCCATCGTGTAGGCAAGCGTTTCTGCGTCAA	527
Query	509	GTCTGCATACGTTCTGGGTAAGATATGGATGGACGAGAATATCAAGCTCAAGAACCACAC	568
Sbjct	528	GTCTGCATACGTTCTGGGTAAGATATGGATGGACGAGAATATCAAGCTCAAGAACCACAC	587
Query	569	CAACAGCGTCATGTTCTGGCTCGTGCGAGATAGGAGACCATATGGTACCCCTATGGACTT	628
Sbjct	588	CAACAGCGTCATGTTCTGGCTCGTGAGAGATAGGAGACCATATGGTACCCCTATGGACTT	647
Query	629	TGGTCAAGTGTTTAAACATGTATGACAACGAGCCCAGTACAGCCACTGTGAAGAACGATCT	688
Sbjct	648	TGGTCAGGTGTTCAACATGTATGACAACGAGCCCAGTACAGCTACTGTGAAGAACGAT-T	706
Query	689	T-CGTGATCGTTTCCAAGTCATGCACAGGTTCTCGGCTAAGGTCACGGTGGACAGTACG	747
Sbjct	707	TGCGTGATCGTTTCCAAGTCATGCACAGGTTCTCGGCTAAGGTCACAGGTGGACAGTATG	766
Query	748	CCAGCAACGAGCAGGCACTGGTTAGGCGTTTCTGGAAGGTGAACAACACTACGTAGTGACA	807
Sbjct	767	CCAGCAACGAGCAGGCATTGGTTAGGCGTTTCTGGAAGGTGAACAACACTACGTCGTGACA	826
Query	808	ACCATCAGGAAGCTGGCAAATACGAGAATCATACTGAGAACGCCCTGCTATTGTATATGG	867
Sbjct	827	ACCATCAGGAAGCTGGCAAATACGAGAATCATACTGAGAACGCCCTGCTATTGTATATGG	886
Query	868	CATGTACTCATGCCTCTAACCCTGTGTACGCGACATTGAAAATTCGAATCTATTTTTATG	927
Sbjct	887	CATGTACACATGCCTCTAACCCTGTGTACGCGACATTGAAAATTCGAATCTATTTTTATG	946
Query	928	ATTCGATAACAAATTAATAAAGTTTGATTTTATTTTCATGATTCTCAAGTACATAAATTA	987
Sbjct	947	ATTCGATAACAAATTAATAAAGTTTGATTTTATTTTCATGATTCTCAAGTACATAAATTA	1006
Query	988	CATAGTATTTTGTTCGGT-GCAAACGAACAACCTCTGATAACAT-GTTTATGCCTATGGCC	1045
Sbjct	1007	CATAGGATTT-GTCCGTCGCAAACGAACAGCTCTGATTACATTGTTTATGCCTATGGCC	1065
Query	1046	CCTAACCTA-GTAAATACA-CATGACGCGAAATCTGA-TCTACT-AAA-ATGTC-TCCCA	1099
Sbjct	1066	CCTAGCGTATGTAATACAACATGACGCGAAATTTGAATCTACTTAAATATGTCGTCCCA	1125
Query	1100	GA-GCTCTCA-CGAA-TC-TCAA-ACTTTGAAAT 1128	
Sbjct	1126	GAAGCTGTCATCGAAGTCGTCCAGACTTGAAAT 1159	

APÉNDICE I. Resultados mostrados por el sistema comparación de secuencias.  
Ejemplo de comparación de la muestra 90.7 con una secuencia de la librería de  
GeneBank.

Tomato yellow leaf curl virus, complete genome  
Length=2781. Score = 1652 bits (894), Expect = 0.0. Identities = 1034/1096  
(94%), Gaps = 32/1096 (2%. Strand=Plus/Plus

```

Query 20      GAGGGTT-C-C-GACGTCACCTGTC-ACCAATCAAATTGCATCCTCAAACGTTAGATAAGT 75
          ||||| | | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 40      GAGGGTTACACAGACGTCACCTGTCACCAATCAAATTGCATCCTCAAACGTTAGATAAGT 99

Query 76      GTTCATTTGTCTTTATATACTTGGTCCCCAAGTATTTTGTCTTGCAATATGTGGGACCCA 135
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 100     GTTCATTTGTCTTTATATACTTGGTCCCCAAGTATTTTGTCTTGCAATATGTGGGACCCA 159

Query 136     CTTCTAAATGAATTCCTGAATCTGTTACGGATTCGTTGTATGTTAGCTATTAATAT 195
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 160     CTTCTAAATGAATTCCTGAATCTGTTACGGATTCGTTGTATGTTAGCTATTAATAT 219

Query 196     TTGCAGTCCGTTGAGGAAACTTACGAGCCAATACATTGGGCCATGATTTAATTAGGGAT 255
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 220     TTGCAGTCCGTTGAGGAAACTTACGAGCCAATACATTGGGCCACGATTTAATTAGGGAT 279

Query 256     CTTATATCTGTTGTAAGGGCCCGTGACTATGTGCAAGCGACCCGGCGATATAATCATTTC 315
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 280     CTTATATCTGTTGTAAGGGCCCGTGACTATGTGCAAGCGACCCAGGCGATATAATCATTTC 339

Query 316     CACGCCCGTCTCGAAGGTTGCGCGAAGGCTGAACTTCGACAGCCCATACAGCAACCGTGC 375
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 340     CACGCCCGTCTCGAAGGTTGCGCGAAGGCTGAACTTCGACAGCCCATACAGCAACCGTGC 399

Query 376     TGCTGTCCCCATTGTCCAAGGCACAAACAAGCGACGATCATGGACGTACAGGCCCATGTA 435
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 400     TGCTGTCCCCATTGTCCAAGGCACAAACAAGCGACGATCATGGACGTACAGGCCCATGTA 459

Query 436     CCGAAAGCCCAGAATATACAGAATGTATCGAAGCCCTGATGTTCCCCGTGGATGTGAAGG 495
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 460     CCGAAAGCCCAGAATATACAGAATGTATCGAAGCCCTGATGTTCCCCGTGGATGTGAAGG 519

Query 496     CCCATGTAAAGTCCAGTCTTATGAGCAGCGGGATGATATTAAGCACACTGGTGTGTTTCG 555
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 520     CCCATGTAAAGTCCAGTCTTATGAGCAGCGGGATGATATTAAGCACACTGGTGTGTTTCG 579

Query 556     TTGTGTTAGTGATGTTACTCGTGGATCTGGAATTACTCACAGAGTCGGTAAGAGGTTCTG 615
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 580     TTGTGTTAGTGATGTTACTCGTGGATCTGGAATTACTCACAGAGTCGGTAAGAGGTTCTG 639

Query 616     TGTTAAATCGATATATTTTTTAGGTAAGGCTGGATGGATGAAAATATCAAGAAGCAGAA 675
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 640     TGTTAAATCGATATATTTTTTAGGTAAGGCTGGATGGATGAAAATATCAAGAAGCAGAA 699

Query 676     TCACACTAATCAGGTCATGTTCTTTTTGGTCCGTGATAGAAGGCCCTATGGAAGTAGTCC 735
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 700     TCACACTAATCAGGTCATGTTCTTTTTGGTCCGTGATAGAAGGCCCTATGGAAGTAGTCC 759

```



Query	323	TCGAAGGTTTCGCCGAAGGCTGAACTTCGACAGCCCATACAGCAACCGTGCTGCTGTCCCC	382
Sbjct	350	TCGAAGGTTTCGCCGAAGGCTGAACTTCGACAGCCCATACAGCAACCGTGCTGCTGTCCCC	409
Query	383	ATTGTCCAAGGCACAAACAAGCGACGATCATGGACGTACAGGCCCATGTACCGAAAGCCC	442
Sbjct	410	ATTGTCCAAGGCACAAACAAGCGACGATCATGGACGTACAGGCCCATGTACCGAAAGCCC	469
Query	443	AGAATATACAGAATGTATCGAAGCCCTGATGTTCCCCGTGGATGTGAAGGCCCATGTAAA	502
Sbjct	470	AGAATATACAGAATGTATCGAAGCCCTGATGTTCCCCGTGGATGTGAAGGCCCATGTAAA	529
Query	503	GTCCAGTCTTATGAGCAGCGGGATGATATTAAGCACACTGGTGTGTTGTTTCGTTGTGTTAGT	562
Sbjct	530	GTCCAGTCTTATGAGCAGCGGGATGATATTAAGCACACTGGTGTGTTGTTTCGTTGTGTTAGT	589
Query	563	GATGTTACTCGTGGATCTGGAATTACTCACAGAGTCGGTAAGAGGTTCTGTGTTAAATCG	622
Sbjct	590	GATGTTACTCGTGGATCTGGAATTACTCACAGAGTCGGTAAGAGGTTCTGTGTTAAATCG	649
Query	623	ATATATTTTTTAGGTAAGGTCTGGATGGATGAAAATATCAAGAAGCAGAATCACACTAAT	682
Sbjct	650	ATATATTTTTTAGGTAAGGTCTGGATGGATGAAAATATCAAGAAGCAGAATCACACTAAT	709
Query	683	CAGGTCATGTTCTTTTTGGTCCGTGATAGAAGGCCCTATGGAAGTAGTCCAATGGATTTT	742
Sbjct	710	CAGGTCATGTTCTTTTTGGTCCGTGATAGAAGGCCCTATGGAAGCAGTCCAATGGATTTT	769
Query	743	GGACAGGTTTTTAATATGTTTCGATAATGAGCCCAGTACCGCAACTGTGAAGAATGATTTG	802
Sbjct	770	GGACAGGTTTTTAATATGTTTCGATAATGAGCCCAGTACCGCAACTGTGAAGAATGATTTG	829
Query	803	CGTGATAGGTTTCAAGTGATGAGGAAATTTTCATGCTACAGTTATTGGTGGGCCCTCTGGA	862
Sbjct	830	CGTGATAGGTTTCAAGTGATGAGGAAATTTTCATGCTACAGTTATTGGTGGGCCCTCTGGA	889
Query	863	ATGAAGGAACAGGCATTAGTTAAGAGATTTTTTAAAAT-AACAGTCATGTAACCTATAAT	921
Sbjct	890	ATGAAGGAACAGGCATTAGTTAAGAGATTTTTTAAAATTAACAGTCATGTAACCTATAAT	949
Query	922	CATCAGGAGGCAGCCAAGTACGAGAACCATACTGAAAACGCCTTGT-ATTGTATATGGCA	980
Sbjct	950	CATCAGGAGGCAGCCAAGTACGAGAACCATACTGAAAACGCCTTGTATTGTATATGGCA	1009
Query	981	TGTACGCATGCCTCTAATCCA-TGTATGCA-CTATGAAA-TACGCATCTATT-CTATGAT	1036
Sbjct	1010	TGTACGCATGCCTCTAATCCAGTGTATGCAACTATGAAAATACGCATCTATTTCTATGAT	1069
Query	1037	-CAATATCAA-TTAATAAAAATTA-ATTTTA-ATCCNGAGTT-CTGGTACATT-ATGGGG	1090
Sbjct	1070	TCAATATCAAATTAATAAAAATTTATATTTTATATCATGAGTTTCTGTTACATTTATTGTG	1129
Query	1091	TTT-CAAG-AC-TCA-ACAATACA-GATC-ACTGCTC-GAAT-CATTGT	1131
Sbjct	1130	TTTTCAAGTACATCATAACAATACATGATCCACTGCTCTGATTACATTGT	1178

APÉNDICE K. Presentación de los resultados de comparación de las secuencias con la librería de referencia GeneBank®.

Muestra	Fragmento Amplificado	Primer	Genoma del Gen bank similitud	Nucleotidos similares (nt)	Porcentaje de similitud (%)	Porcentaje de cobertura (%)
89	Anillo de begomovirus (prAC1154 y prAV2644)	prAC1154	Pepper golden mosaic virus cepa Tamaulipas componente A, secuencia completa	1762	95%	94%
			Pepper golden mosaic virus aislado PepGMV-Mo segmento DNA-A, secuencia completa	1639	93%	93%
			Pepper golden mosaic virus aislado PepGMV-D segmento DNA-A, secuencia completa	1602	93%	93%
			Pepper golden mosaic virus aislado PepGMV-Ser segmento DNA-A, secuencia completa	1556	92%	94%
		prAV2644	Pepper golden mosaic virus cepa Tamaulipas componente A, secuencia completa	1622	95%	87%
			Pepper golden mosaic virus aislado PepGMV-Mo segmento DNA-A, secuencia completa	1507	93%	90%
			Pepper golden mosaic virus aislado PepGMV-D segmento DNA-A, secuencia completa	1482	93%	87%
			Pepper golden mosaic virus aislado PepGMV-Ser segmento DNA-A, secuencia completa	1426	92%	87%
			Pepper golden mosaic virus-[CR] proteína capsida (AV1), AC3 (AC3), AC2 (AC2), y genes de la proteína de replicación iniciación (AC1) genes, complete cds	1393	92%	87%
		90.7	Anillo de begomovirus (prAC1154 y prAV2644)	prAC1154	Tomato yellow leaf curl virus, complete genome	1652
Tomato yellow leaf curl virus-[Dominican Republic], infectious clone, complete genome	1652				94%	79%
Tomato yellow leaf curl virus from USA, complete genome	1635				94%	79%
Tomato yellow leaf curl virus-[Cuba] complete genome	1635				94%	79%
Tomato yellow leaf curl virus isolate Ra3, complete genome	1615				94%	78%
prAV2644	Tomato yellow leaf curl virus, complete genome			1615	93%	80%
	Tomato yellow leaf curl virus-[Dominican Republic], infectious clone, complete genome			1611	93%	79%
	Tomato yellow leaf curl virus -[Puerto Rico], complete genome			1604	93%	80%
	Tomato yellow leaf curl virus from USA, complete genome			1598	93%	80%
	Tomato yellow leaf curl virus from Martinique precoat protein (AV2) and coat protein (AV1) genes, complete cds			1596	94%	75%

91	Anillo de begomovirus (prAC1154 y prAV2644)	prAC1154	Tomato yellow leaf curl virus, complete genome	1884	97%	91%
			Tomato yellow leaf curl virus-[Dominican Republic], infectious clone, complete genome	1884	97%	91%
			Tomato yellow leaf curl virus from USA, complete genome	1868	96%	91%
			Tomato yellow leaf curl virus-[Cuba] complete genome	1868	96%	91%
			Tomato yellow leaf curl virus isolate Ra3, complete genome	1849	96%	91%
		prAV2644	Tomato yellow leaf curl virus, complete genome	1821	96%	88%
			Tomato yellow leaf curl virus-[Dominican Republic], infectious clone, complete genome	1821	96%	88%
			Tomato yellow leaf curl virus from USA, complete genome	1805	95%	88%
			Tomato yellow leaf curl virus from Martinique precoat protein (AV2) and coat protein (AV1) genes, complete cds	1801	96%	87%
			Tomato yellow leaf curl virus-[Cuba] complete genome	1799	95%	88%
92	Anillo de begomovirus (prAC1154 y prAV2644)	prAC1154	Okra yellow mottle Iguala virus segment A, complete sequence	632	86%	43%
			Sida yellow mosaic Yucatan virus segment DNA-A, complete sequence	623	86%	41%
			Chino del tomate virus-[IC] component A AV1 protein, AC3 protein, AC2 protein, AC1 protein, and AC4 protein genes, complete cds	616	85%	43%
			Okra yellow mosaic Mexico virus - Santa Teresa 2 isolate 3abg replication associated protein (AC1) gene, partial cds; coat protein (AV1), replication enhancer protein (AC3), and transcription activator protein (AC2) genes, complete cds; and replication associated protein (AC1) gene, partial cds	606	86%	41%
			Chino del tomate virus-[RK] variant segment A	593	85%	43%
		prAV2644				

APÉNDICE L. Información anexa para la realización de la metodología.

Mezcla de reacción para la amplificación parcial (gen AV) del Anillo A de *Begomovirus*

Reactivo	Concentración stock	Volumen a agregar del stock
Agua doble destilada	--	11.08 µL
Solución Amortiguadora	5X	5.0 µL
MgCl <sub>2</sub>	25Mm	2.75 µL
Cebador prAC1154	20Mm	0.65 µL
Cebador prAV2644	20mM	0.65 µL
dNTP's	2.5Mm	1.6 µL
Taq ADN polimerasa	5U/µL	0.27 µL
AND	--	3.0 µL

APÉNDICE M. Iniciadores de PCR para la amplificación parcial (gen AV) del Anillo A de *Begomovirus*

Nombre el Cebador	Temperatura de templado	Secuencia
prAC1154	52.8 °C	(5' CT(G/C)AA(C/T)TTC(A/C)AAGT(C/T)TGGACG 3'
prAV2644	55.4 °C	(5' ATTACCGGATGGCCGC 3')

APÉNDICE N. Programa de PCR para la amplificación parcial (gen AV) del Anillo A de *Begomovirus*.

Paso 1:	2 minutos a 95°C
Paso 2:	1.0 minuto a 95°C
Paso 3:	1.0 minuto a 60°C
Paso 4:	1.0 minuto a 72°C
Ir al paso 2, 29 veces	
Paso 5:	5 minutos a 72°C
Paso 6:	4°C indefinidamente

APÉNDICE O. Solución amortiguadora TAE 50X, para un litro.

Reactivo	Cantidad
Tris base	242 g
Acido acético	57.1 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	100.0 mL

Ajustar volumen a un litro.

APÉNDICE P. Solución amortiguadora TAE 1X, para un litro.

Reactivo	cantidad
Buffer TAE 50X	20mL
Agua desmineralizada	980mL

APÉNDICE Q. Preparación de solución amortiguadora de lisis para mosca blanca.

Reactivo	Cantidad
Proteinasa k	0.001g
Agua doble destilada	989.0 $\mu$ L
Tris-HCl 1M pH 8	5 $\mu$ L
EDTA 0.5M pH 8	1 $\mu$ L
Nonidet P-40	5 $\mu$ L
Volumen total	1000 $\mu$ L

APÉNDICE R. Preparación de solución amortiguadora de extracción para material vegetal.

Nombre de reactivo	Cantidad de Reactivo	Concentración Final de Solución
Tris pH 8.0	14.88 g	100mM
EDTA pH 8.0	9.306 g	50mM
NaCl	14.61g	500mM
2-mercaptoetanol	22.5 $\mu$ L	10mM
H <sub>2</sub> O	Aforo a 1 litro	

APÉNDICE S. Equipos utilizados en metodología.

Equipo	Marca	Especificaciones
Termociclador	MJ Reseach, Inc.	Modelo PTC-100
Fuente de poder	Sigma Aldrich Techware	PS 251-1
Cámara de electroforesis horizontal		Mod. E 0638; 259 V DC; límites de operación 15W, 60mA, 50°C
Micro pipetas	Eppendorf	2, 10, 200, 1000 $\mu$ l
Balanza analítica	Mettler	Modelo AE 163

## APÉNDICE T. Reactivos utilizados en metodología.

<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>
Tris-HCl	Sigma
Nodidet p-40	Sigma
EDTA	Sigma
Proteínasa K	Promega
Deoxinucleótidos trifosfatados	Promega
Solución amortiguadora 5X para PCR	Promega
Taq ADN polimerasa	Promega
Marcador de masa molecular de 1Kb	Promega
Acetato de Sodio	Merck
Isopropanol	Merck
Alcohol Isoamilico	J. T. Baker
Cloroformo	Merck
Fenol	Merck
Cloruro de sodio	Merck
Etanol	Distribuidora Mario Bathen
Dodecil Sulfato de Sodio	J.T. Baker
Acetato de Potasio	J. T. Baker
Bromuro de etidio	
Cebadores p514	Invitrogen
Cebadores p1048	Invitrogen
Cebadores PTYIRv21	IDT
Cebadores pTYIRc287	IDT