

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA**
Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis filogeográfico de los biotipos de
Bemisia tabaci en diferentes regiones de
Guatemala utilizando el gen citocromo oxidasa
I (COI) como marcador mitocondrial.

Trabajo de graduación presentado por
Arnoldo Font Nájera
para optar al grado académico de Licenciado en
Biología

Guatemala
2009

Análisis filogeográfico de los biotipos de
Bemisia tabaci en diferentes regiones de
Guatemala utilizando el gen citocromo oxidasa
I (COI) como marcador mitocondrial.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA**
Facultad de Ciencias y Humanidades

Análisis filogeográfico de los biotipos de
Bemisia tabaci en diferentes regiones de
Guatemala utilizando el gen citocromo oxidasa
I (COI) como marcador mitocondrial.

Trabajo de graduación presentado por
Arnoldo Font Nájera
para optar al grado académico de Licenciado en
Biología.

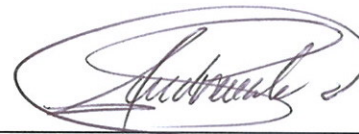
Guatemala
2009

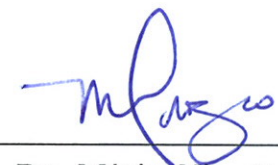
Vo. Bo. :

(f) 
Licda. Margarita Palmieri Santisteban

Tribunal Examinador:

(f) 
Licda. Margarita Palmieri Santisteban

(f) 
Lic. Andrés Weinfeld Ávalos Figueroa

(f) 
Dra. Mónica Ninnette Orozco Figueroa

Fecha de aprobación: Guatemala 05 de Junio del 2009.

PREFACIO

El presente trabajo de graduación se realizó conjuntamente con los proyectos titulados “Detección de biotipo Q de *Bemisia tabaci* en tomate mediante marcadores de ADN mitocondrial” con fondos de la línea FODECYT (025-2007) y el proyecto: “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” con fondos de la línea AGROCYT (031-2005).

Durante el trabajo se logró amplificar el gen COI (Citocromo Oxidasa I) de 297 individuos de *B. tabaci* colectados a lo largo de Guatemala de una muestra total de 390 individuos. Las muestras se escogieron en base a las diferentes regiones, tipos de cultivos, intervalos de altura, temporada (seca y después de la lluvia) e inclusive de diferentes años (2006 – 2008). A partir de dichas muestras se elaboró un protocolo de detección de los diferentes biotipos que están presentes en Guatemala por medio de la técnica de SSCP's (Polimorfismo de la conformación de una sola banda). Las muestras que presentaron un patrón diferente se enviaron y secuenciaron en la Universidad de Arizona para observar el polimorfismo. El conocimiento de las secuencias y los diferentes polimorfismos por la técnica de SSCP's también permitió determinar la asociación o dependencia existente con el tipo de cultivo, región, altura y temporada.

Las mayores limitaciones en el proyecto se dieron en la selección de las muestras. Muchos de los individuos presentaron dificultad de amplificación del gen COI, en especial los colectados en cultivos meloneros. Sin embargo, se cree que el mal almacenamiento de dichas muestras pudo haber afectado. La elección de varias familias de cultivos por región también representó otra limitación, ya que las colectas de los viajes realizados en 2006 y 2007 eran mayoritariamente de solanáceas. Finalmente, muchas de estas muestras ya habían sido utilizadas por proyectos anteriores, por lo que se recurrió a escoger las que habían disponibles y en mejor estado.

Agradezco personalmente a Licda. Margarita Palmieri por la oportunidad de trabajar como investigador principal y asociado en el desarrollo del conocimiento de mosca blanca para Guatemala, así también del uso de las instalaciones, reactivos y equipo del laboratorio de Protección Vegetal en la Universidad del Valle de Guatemala.

Agradezco a la Dr. Judith K. Brown de la Universidad de Arizona por haber compartido su tiempo en la enseñanza y entendimiento del programa DNA Star Lasergene 8.0. De la misma forma, agradezco por el uso de las instalaciones, reactivos y equipo prestados en los laboratorios del departamento de ciencias de plantas, durante mi estadía en Arizona.

Agradezco a mi compañero de trabajo de campo y amigo Wilfredo López, por su ayuda en la realización de los viajes de campo para la colecta de mosca blanca en las diferentes regiones de Guatemala.

A mis compañeros y amigos, Lol, Sofía, Alejandra, María José, Lucía, Olga y en especial a Heinz, Paola y Otto por su constante amistad y apoyo para terminar mi tesis.

Finalmente quisiera agradecer a mi familia, en especial a mi mamá y hermano por su constante apoyo durante todo el proceso, pero en especial a mi papá por su ayuda en las colectas de mosca blanca en el norte de Guatemala.

INDICE DE CONTENIDOS

PREFACIO.....	vi
LISTADO DE CUADROS.....	xi
LISTADO DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv

Capítulos

I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes.....	2
1. Biología de la mosca blanca.....	2
a. Morfología y ciclo de vida.....	2
b. Reproducción.....	3
c. Hábitos migratorios.....	3
2. Efectos de la plaga de la mosca blanca.....	4
a. Los vectores y sus afecciones.....	4
b. Los geminivirus.....	4
c. Los geminivirus en Guatemala.....	6
3. Variabilidad del complejo <i>B. tabaci</i>	7
4. Los biotipos de mosca blanca en Guatemala.....	8
a. Biotipo B.....	8
b. Biotipo A.....	9
c. Biotipo Q.....	9
d. Biotipo G.....	9
5. Estudios bioquímicos y moleculares.....	11
B. Justificación.....	14
C. Objetivos.....	14
D. Hipótesis.....	15
II. MÉTODOS.....	16

A.	Recolección de mosca blanca.....	17
B.	Selección del número y estrategia de muestreo.....	17
C.	Clasificación de mosca blanca.....	19
D.	Protocolos moleculares para detección del gen CO1 mitocondrial.....	20
E.	Análisis filogenético	20
F.	Análisis de datos	21
III.	RESULTADOS.....	22
A.	Abundancia de mosca blanca.....	22
B.	Secuenciación y análisis filogenético.....	23
C.	Protocolo SSCP's del gen CO1 de <i>B. tabaci</i>	26
D.	Análisis de datos	31
1.	Asociación entre biotipo, altura y región.....	31
2.	Asociación entre biotipo y tipo de cultivo.....	33
3.	Asociación entre biotipo y temporada de colecta.....	33
IV.	DISCUSIÓN.....	35
A.	Método de selección de muestras.....	35
B.	Filogenia de <i>B. tabaci</i> para Guatemala	36
C.	Protocolo SSCP's del gen CO1 para <i>B. tabaci</i>	37
D.	Factores asociados a la distribución de biotipos de <i>B. tabaci</i>	38
1.	Biotipos criollos.....	38
a.	Región y altura	38
b.	Tipo de cultivo.....	38
c.	Temporada.....	39
2.	Biotipos introducidos.....	39
E.	Comparaciones con otros monitoreos de mosca blanca	40
V.	CONCLUSIONES.....	43
VI.	RECOMENDACIONES.....	44
VII.	LITERATURA CITADA	45

VIII. APÉNDICES	49
A. Machote para obtención de datos en viaje de campo.....	49
B. Extracción de ADN de mosca blanca almacenada en etanol	50
C. Amplificación del gen Citocromo Oxidasa I (COI).....	51
D. Comprobación de los productos de PCR en geles de agarosa al 1%.....	52
E. Polimorfismo de la conformación de una sola banda de ADN	53
F. Protocolo de la revelación de polimorfismos por tinción de plata	55
G. Desecado de geles de poliacrilamida.....	56
H. Especificaciones generales de equipo, material y reactivos.....	57
I. Identificación de mosca blanca por sitios de colecta	59
J. Comparación de secuencias de los diferentes biotipos registrados	63
K. Identificación de biotipos de <i>B. tabaci</i>	66

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Tipos de geminivirus en tomate actualmente descritos para América Central.....	6
Cuadro 2. Incidencia de biotipos de <i>B. tabaci</i> por región y por tipo de cultivo durante el monitoreo 1998 – 1999 en las regiones oriente y sur de Guatemala	10
Cuadro 3. Incidencia de biotipos de <i>B. tabaci</i> por temporada e intervalos de altura durante el monitoreo 1998 – 1999 en las regiones oriente y sur de Guatemala.	11
Cuadro 4. Polimorfismos registrados para las secuencias del gen COI de los diferentes biotipos de <i>B. tabaci</i>	24
Cuadro 5. Matriz de porcentaje de similitud y distanciamiento de nucleótidos de las diferentes secuencias de mosca blanca en el proceso de secuenciación.....	24
Cuadro 6. Resultados generales del estadístico de regresión lineal para el cálculo de los pesos moleculares de las bandas expresadas por los polimorfismos de <i>B. tabaci</i>	28

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de la mosca blanca <i>B. tabaci</i>	2
Figura 2. Discriminación entre un fitopatovirus y un geminivirus.....	5
Figura 3. Análisis filogeográfico del complejo de biotipos de <i>B. tabaci</i> a nivel global utilizando el gen Citocromo Oxidasa I (COI).....	12
Figura 4. Árbol filogenético de <i>B. tabaci</i> en base al marcador COI mitocondrial, monitoreo de mosca blanca en la región oriente y sur de Guatemala 1998 – 1999	13
Figura 5. Esquema de demostración de selección de muestras de <i>B. tabaci</i> por región, temporada, altura y familia de cultivo.	18
Figura 6. Posición de omatidios en la cabeza de algunas de las especies de mosca blanca más comunes para Guatemala.....	19
Figura 7: Distinción entre géneros de mosca blanca utilizando como criterio la forma y el segmento final del abdomen.	19
Figura 8. Porcentaje de abundancia de las especies de mosca blanca capturadas en Guatemala para el presente estudio (2006 – 2008).....	22
Figura 9. Porcentaje de abundancia de las especies de mosca blanca capturadas en las diferentes regiones de Guatemala para el presente estudio (2006 – 2008).....	23
Figura 10. Análisis filogenético del gen COI de <i>B. tabaci</i> para Guatemala 2006 - 2008.	25
Figura 11. Análisis filogenético del gen COI del clado americano de <i>B. tabaci</i> para Guatemala 2006 - 2008.....	26
Figura 12. Migración y determinación de los pesos moleculares de las bandas de los diferentes polimorfismos de <i>B. tabaci</i> por medio de la técnica de SSCP's	27
Figura 13. Modelo lineal para el cálculo de los pesos moleculares de las pruebas de SSCP's en biotipos de <i>B. tabaci</i>	28
Figura 14: Esquemización general de los diferentes polimorfismos obtenidos de los biotipos de <i>B. tabaci</i> en Guatemala por medio de la técnica de SSCP's para el gen COI.	29
Figura 15: Demostración de la irregularidad de los patrones obtenidos en diferentes biotipos de <i>B. tabaci</i> establecidos mediante la técnica de SSCP's.	30
Figura 16: Porcentaje de biotipos de <i>B. tabaci</i> detectados en las diferentes regiones de Guatemala durante 2006-2008.....	32
Figura 17: Porcentaje de biotipos de <i>B. tabaci</i> según intervalos de altura de Guatemala 2006 – 2008.....	32

Figura 18: Distribución geográfica de los biotipos de <i>B. tabaci</i> en Guatemala, 2006 - 2008.....	32
Figura 19: Porcentaje de biotipos de <i>B. tabaci</i> por tipo de cultivo en Guatemala 2006 – 2008.....	33
Figura 20: Porcentaje de biotipos por temporada y región de Guatemala 2006 – 2007.	34

RESUMEN

La necesidad de la elaboración de estudios de la ecología y biología de *B. tabaci* han aumentado en respuesta al decaimiento del sector agrícola en todo el mundo. Guatemala no parece ser la excepción, ya que a partir de los ochentas se han detectado distintos biotipos de mosca blanca que están asociados con problemas de infección de *Begomovirus*, entre ellos B y Q más recientemente. En el presente se propuso la elaboración de un protocolo para distinguir entre los diferentes biotipos que se encuentran en Guatemala mediante la técnica de SSCP's y la elaboración de su respectiva filogenia en base al gen COI. El análisis filogenético definió siete biotipos diferentes (G1, G2, G3, G4.1, G4.2, G5 y G6 respectivamente) cuyo polimorfismo está basado en ocho sustituciones o deleciones de nucleótidos, de un total de 780 pb analizados del gen COI. Sin embargo, las regiones de polimorfismo son compartidas entre varios, lo cual permite especular de que a pesar de que comparten áreas simpátricas existe la posibilidad de aislamiento genético. El protocolo de SSCP's presentó dificultad en la visualización de los patrones respectivos de cada biotipo; sin embargo, se puede diferenciar fácilmente entre los biotipos A, B y G (excepto entre los diferentes que forman G).

Se determinó que los biotipos de *B. tabaci* son dependientes con el tipo de cultivo, región, temporada e intervalo de altura. El biotipo G1 se encontró en todas las regiones especialmente en el oriente y centro (excepto en la occidental que no se encontró *B. tabaci*). G2 y G3 fueron mayormente abundantes en el norte y sur respectivamente. Con respecto a las plantaciones la dependencia puede ser discutible, ya que algunos biotipos fueron encontrados sólo una vez en un tipo de cultivo, mientras que otros con preferencias polífagas. El biotipo G5 fue el único en presentar preferencia en tomate. Con respecto a la temporada se encontró que el G1 siempre obtuvo mayor abundancia en las regiones oriente y centro para ambas temporadas (seca y después de las lluvias), en cambio el G5 solamente se detectó después de las lluvias para ambas regiones. El biotipo B no se detectó, posiblemente debido al poco muestreo en plantaciones de cucúrbitas. El biotipo Q tampoco fue detectado, posiblemente debido a que no se ha adaptado aún.

Finalmente, las comparaciones con otros monitoreos de años pasados determinaron la existencia de similitud entre el biotipo G1 del presente estudio con el G5 de 1999 y el G3 del presente año con el G6 de 1999; sin embargo, fueron detectados por diferentes técnicas: en 1999 por detección de proteínas (esterasas no específicas) y la actual por medio de ácidos nucleicos (SSCP's y secuenciación).

ABSTRACT

The studies in the knowledge on *B. tabaci* biology and ecology have been increased lately, in response to the decay of the agricultural sector in the entire world. Guatemala is no longer the exception, since from the late 80's there have been detections from new biotypes related to *Begomovirus* infections. These biotypes have been classified as B and Q more recently. The purpose of this study is to incorporate a protocol for the biotypes distinction in Guatemala through the SSCP's molecular process and the phylogenetic analysis construction based on the COI gene. The phylogeny explained seven different biotypes (named G1, G2, G3, G4.1, G4.2, G5 and G6), based only on the substitution or deletion of eight nucleotides, in a total of 780 bp analysed from the COI gene. However, most of the polymorphism regions are shared between all of the biotypes detected, which could explain that even if they share sympatric areas they might experiment genetic isolation. The protocol established of SSCP's expressed difficulties when observing the patterns to differentiate each biotype. However, biotypes A, B and G can be differentiated easily (except in between the different biotypes of G).

The dependency or relation between the biotype and the type of crop, region, season (dry and after the rainy season) and height was detected. Biotype G1 was detected in most of the regions, specially the east and the centre (except at the occident where there was no detection of *B. tabaci*). Biotypes G2 and G3 had more abundance at north and south respectively. With respect to the type of crops the dependency can be debatable, since some of the biotypes were found in just one crop and others had polyphagous preferences at the same time. Biotype G5 was the only one to infect only tomato. Finally, Biotype G1 was found again to be much more abundant in east and in the centre of both seasons. Only G5 had a pattern to appear after winter season (it was never detected on dry season). B biotype was not detected, since there was little sampling from the Cucurbitaceae. Q biotype was also not detected, maybe because it may not have adapted to different crops in Guatemala yet.

Finally, we compared the results from this study with others made before. We found out that biotype G1 was very similar to G5 from 1999, and G3 was similar to G6 from 1999. However, they were detected with different technics: In 1999 with a protein technic (non specific esterases) and the newer with nucleic acids (SSCP's and sequenciation).

I. INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre la ecología y biología de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) han adquirido mayor atención durante los últimos treinta años. Las pérdidas millonarias en el sector agrícola reflejan la necesidad de la elaboración de métodos eficaces para controlar la plaga sobre los cultivos hospedantes, pero el abuso en la aplicación de insecticidas y otros métodos de control han permitido que adquiriera parcial o casi total resistencia. Además, se ha facilitado el transporte de moscas vectores y/o plantas infectadas mediante la exportación, lo cual ha propiciado la expansión de la especie y, en cierto punto, el aumento de su capacidad para adaptarse a situaciones nuevas. Esto ha permitido la formación de lo que conocemos como “Biotipo”, ya que son poblaciones que a pesar de que no pueden ser diferenciadas por sus características morfológicas sí pueden serlo mediante su habilidad reproductiva, capacidad de adaptación a condiciones adversas o para atacar nuevos cultivos (Bush 1994).

Estudios previos han detectado al menos 19 biotipos diferentes mediante técnicas bioquímicas de estererasas no específicas, aunque actualmente el estudio de genes, como Citocromo Oxidasa I (COI) y 16S ribosomal, han demostrado que esta variación puede ser mayor a nivel molecular (Brown *et al.* 1999). Guatemala no parece ser la excepción, ya que se ha logrado detectar tanto variación fenotípica como molecular dentro de las razas criollas o nativas, al igual que la experimentada por los biotipos introducidos desde el viejo mundo (B y Q). A pesar de que se ha realizado investigación a nivel molecular en nuestro país, ésta no ha permitido resolver el problema de ambigüedad en su reconocimiento (Orozco 1999, Palmieri *et al.* 1999). Con el objetivo de aclarar este problema, se promovió el uso de la técnica de PCR, detección de polimorfismo en una sola banda de ADN (SSCP por sus siglas en inglés) y la secuenciación de los polimorfismos, utilizando la variabilidad que presentó el gen Citocromo Oxidasa I (COI) en las diferentes muestras colectadas alrededor de todo el país. Finalmente se construyó una filogenia, además de estudiar la asociación entre las variables altura, tipo de cultivo y temporada con la variable biotipo.

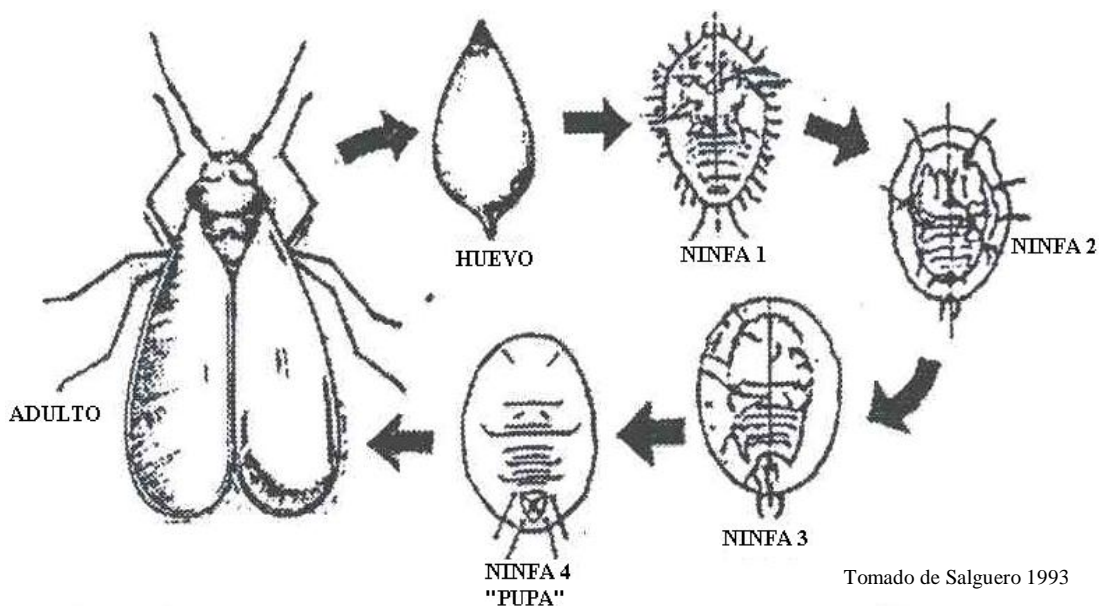
A. Antecedentes

1. Biología de la mosca blanca

a. **Morfología y ciclo de vida.** Perteneciente al orden de los Homópteros y de la familia Aleyrodidae (“*Aleyron*” del latín que significa harina), debido a la fina capa de polvo blanco que segregan sobre su cuerpo a través de unas glándulas en posición ventral (Cabello *et al.* 1996).

Posee un ciclo de vida formado por un huevo, larva, pupa y la metamorfosis al adulto, con algunas excepciones (Figura 1). Se desarrollan tres diferentes estados en la larva, los cuales simplemente son designados como ninfas tipo I, II y III respectivamente. De la misma manera, el nombre pupa representa un problema al no presenciar una muda pupal para la metamorfosis al adulto, la cual no es característica esencial para este tipo de fase. Debido a lo anterior, muchos entomólogos han adoptado la terminología como ninfa tipo IV en vez de pupa, aunque en realidad la terminología larva y pupa aún es utilizado para la especie (Leston 1999).

Figura 1. Ciclo de vida de la mosca blanca *B. tabaci*



Los huevos presentan forma elíptica asimétrica, con un color blanquecino característico. Son depositados por la hembra preferentemente bajo el haz de las hojas de su hospedero. La forma de

disposición es muy variable, ya sea en pequeños grupos separados de forma irregular o grupos en semicírculos mediante el movimiento de su abdomen en forma de abanico. Los mismos quedan unidos a su hospedero por medio de una estructura llamada pedicelo, el cual además permitirá la alimentación como órgano chupador de fluidos vegetales (Cabello *et al.* 1996).

Las larvas son ovaladas, aplanadas, con un color amarillento translúcido y contornos irregulares. Los mismos difieren según la función que realicen y el desarrollo morfológico que presenten: en el primer estado, la larva se mueve a un sitio esencial para la obtención de su alimento, en donde introduce su estilete y se fija permanentemente. En el segundo, la larva tiene un aspecto cremoso transparente, el cual desarrolla patas y antenas rudimentarias. En el tercero se conserva el aspecto anterior, únicamente que adquiere mayor tamaño corporal. Finalmente en el cuarto (conocido también como pupa) ocurre la pérdida del estado de alimentación, abultamiento, coloración verde amarilla y el desarrollo de los ojos. El proceso tarda un mes de desarrollo, aproximadamente una semana por cada período. El adulto emerge finalmente de la pupa o ninfa tipo IV (Cabello *et al.* 1996).

Los adultos se caracterizan por tener ojos rojos oscuros con grupos de omatidios unidos al centro por un par de los mismos. En reposo, sus alas se pliegan sobre el dorso formando un tejadillo rectangular (Leston 1999).

Su ciclo de vida depende de factores como la temperatura, humedad y el hospedero. En cultivos de algodón sometidos de 30 a 33° C el huevo puede desarrollarse en tan solo tres semanas, pero por encima de esta temperatura el ritmo de desarrollo vuelve a decrecer (aunque esto depende totalmente del biotipo de mosca blanca). Finalmente, el factor nutricional del hospedero también presenta un factor independiente para el desarrollo de las larvas. Si el cultivo está sometido a mucho estrés para la obtención de alimento, el huevo no podrá obtener la suficiente nutrición para un desarrollo normal (Cabello *et al.* 1996).

b. Reproducción. Puede ocurrir tanto a nivel sexual como por partenogénesis. En la reproducción sexual participan tanto el macho y la hembra para producir progenie de ambos sexos. En la partenogénesis la hembra fertiliza sus propios óvulos sin la necesidad de que participe un macho; en el caso de *B. tabaci* se producen únicamente machos (arrenotoquía), especialmente cuando se encuentra en un área que presenta estrés ambiental. Esta capacidad tiene influencia en la facilidad de que pueda desarrollar nuevos biotipos, e inclusive resistencia a cierto tipo de insecticidas (Byrne y Bellows 1991).

c. Hábitos migratorios. Debido al corto tiempo de vida que presentan los adultos, estos tienden a migrar solamente entre las plantas más próximas. Éstas tienden a marcharse a cultivos anexos solamente cuando su hábitat está amenazado por el constante deterioro. El transporte efectivo que determina la localidad de su paradero está determinada por la dirección del viento (Gerling & Horowitz 1984). Sin embargo, también tienden a emigrar hacia los cultivos recién sembrados. En Guatemala se

comprobó que la mayoría de áreas de cultivo de tomate infestadas eran las que estaban sometidas a la entrada de viento (Dubón *et al.* 1993).

2. Efectos de la plaga de la mosca blanca. Las infestaciones de la mosca blanca, también conocida comúnmente como la mosca del tabaco, del camote o del algodón (Cock 1986) han adquirido mayor importancia en los sistemas agrícolas secos y tropicales situados en América durante los últimos 30 años. Los enormes aumentos de densidad poblacional y su asociación con enfermedades virales han delimitado en crisis a ciertos productos alimentarios y textiles en toda la región (Brown *et al.* 1991; Brown y Bird 1995). El uso exagerado de insecticidas se ha vuelto cada vez más indispensable para controlar la densidad poblacional; sin embargo, los individuos sobrevivientes adquieren resistencia obligando a que en situaciones futuras se utilicen concentraciones más altas o combinaciones de insecticidas (Alvarado 1991).

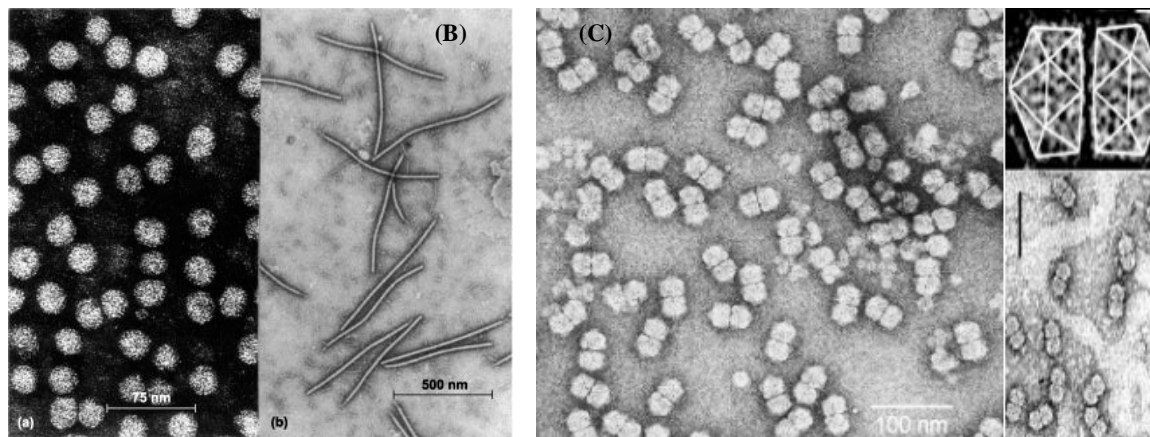
a. Los vectores y sus afecciones. En los últimos años las investigaciones han aumentado considerablemente en dos especies de mosca blanca: *Trialeurodes vaporariorum* y *B. tabaci*, ya que ambas presentan una amenaza de riesgo para varios tipos de cultivos a nivel mundial (Hilje 2003). Entre los cultivos mayormente afectados encontramos el algodón, calabaza, chile, lechuga, varias leguminosas, melón, okra, pepino, sandía y tomate, aunque se ha determinado que también pueden parasitar malezas (Brown 1994).

Las afecciones que realizan sobre sus hospederos pueden ser transmitidos de forma directa: cuando el adulto o la ninfa se alimenta a través de su estilete inyectando toxinas que desarrollan síntomas como la clorosis y debilidad de los tejidos vegetales. De forma indirecta secretando maleza o una secreción azucarada sobre el hospedero y permitiendo el posterior crecimiento de fumagina (*Capnodium* spp.) sobre el tejido foliar, hojas y frutos promoviendo la asfixia vegetal, dificultad de fotosíntesis, disminución de crecimiento, entre otros. En el caso específico de *B. tabaci*, se considera un caso más severo, ya que puede ser vector potencial para varios tipos de virus como el *Carlavirus*, *Luteovirus*, *Nepovirus*, *Potyvirus*, *Closterovirus* y *geminivirus* (Brown 1994). Aunque es vector de todos estos virus, se ha determinado preferencia hacia los virus de la familia *Geminiviridae*, ya que se conoce que transmite al menos 70 diferentes tipos de *Begomovirus* o *geminivirus* (Markham *et al.* 1996).

b. Los geminivirus. Las primeras transmisiones por *B. tabaci* no fueron detectadas sino hasta que en 1975 se descubrió que la enfermedad del mosaico dorado de tomate estaba asociada con partículas típicas de un tipo de *geminivirus* en Brasil (Matys *et al.* 1975). Sus características parecían no seguir el patrón general de la estructura de un fitopatovirus, de modo que incorporó nuevas observaciones en el campo de la virología. Un fitopatovirus estaba caracterizado por poseer partículas isométricas o alargadas, las cuales a su vez encapsulan una simple hebra de la molécula ARN. En cambio los *geminivirus* poseen estructuras casi isométricas formando parejas, y que al mismo tiempo cada una encapsula una molécula de

ADN simple hebra cuyo número de nucleótidos puede variar desde 2265 a 3200 aproximadamente (Stanley 1985), ver Figura 2.

Figura 2. Discriminación entre un fitopatovirus y un geminivirus



(a) Forma isométrica del fitopatovirus *pea seed-borne mosaic virus*; (b) Forma anisométrica del fitopatovirus *Tobacco streak virus*; (c) Estructura general de un Geminivirus: *Begomovirus*. Tomado de Stanley 1985.

Actualmente se han detectado más de 70 tipos de geminivirus (Markham *et al.* 1996), de los cuales solamente 20 han logrado ser completamente clasificados conforme a la posición 805 de la región N – terminal del gen de replicación. Sin embargo, en América Central sólo ocho han sido totalmente identificados para tomate (Cuadro 1) (Nakhla *et al.* 2005). El resto representa en su mayoría variaciones dentro de la misma clasificación del virus, las cuales podrían ser respuesta a la enorme capacidad que tiene el vector para adaptarse a nuevos ambientes y que al mismo tiempo ha permitido que el virus sobreviva y se adapte conjuntamente. En algunos casos el vector como el virus se adaptan tanto a un solo hospedero o a una serie de cultivos, de tal forma que todo el proceso de ciclo de vida del vector, la transmisión y desarrollo del virus se da solamente en éstas. Tales adaptaciones son responsables de que el virus esté ligado muchas veces sólo a un haplotipo, raza o biotipo para asegurar su transmisión (Brown y Bird 1995).

Su forma de transmisión se basa en la relación persistente – circulatoria que contiene con su vector. Las partículas virales se obtienen al alimentarse del floema de una planta infectada, pasando a la hemolinfa después de atravesar los intestinos. La acumulación ocurre en las glándulas salivares por medio de pinocitosis al ingresar por la lámina basal, luego éstas son conducidas al conducto salival por medio de exocitosis (Federes 2003). Después del período de adquisición, el vector entra en un período de latencia, el cual puede variar de 4 a 20 horas según el tipo de virus y la temperatura ambiental. Al infectar una planta nueva, el virus es transportado por la savia hasta el núcleo de las células del floema. Estas células acumulan una cantidad enorme de partículas virales formando densas inclusiones que pueden llegar a

ocupar casi todo el espacio nuclear. Estas pueden llegar a obstaculizar los procesos y funciones nucleares produciendo apoptosis¹ (Lastra y Gil 1980).

Cuadro 1. Tipos de geminivirus en tomate actualmente descritos para América Central

Clasificación	Nombre
PepGMV	Pepper golden mosaic virus
PHYVV	Peper hausteco virus
ToLCSinV	Tomato leaf curl sinaloa virus
ToMHV	Tomato mosaic havana virus
ToMiMoV	Tomato mild mottle virus
ToGMoV	Tomato golden mottle virus
ToSLCV	Tomato severe leaf curl virus
ToYMoV	Tomato mottle taino virus

Fuente: (Nakhla *et al.* 2005)

c. Los geminivirus en Guatemala. Durante los setentas, los efectos de la virosis aumentaron considerablemente con las primeras siembras de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en el sureste. Estas fueron culpadas de transmitir la mosca blanca a los cultivos de frijol, además de desarrollar los primeros síntomas del virus dorado del mosaico de frijol en 1976 (VDMF). Sin embargo, su emigración hacia otros tipos de cultivos fue inevitable, ya que las poblaciones fueron difícilmente controladas (Dardón 1993).

Durante los sesentas, el algodón ya había sido uno de los cultivos más afectados por *B. tabaci*. Fue encontrada dentro de las nueve especies plaga, pero su afección inicial estaba mayoritariamente atribuida al aumento poblacional que al efecto de la virosis. La enorme demanda que existía por la producción algodonera obligó a que cada vez se utilizaran concentraciones y combinaciones más fuertes de insecticidas, en algunos casos hasta 60 diferentes. Como consecuencia, el número de plagas aumentó a 24 y las poblaciones de *B. tabaci* adquirieron resistencia (Dardón 1993). Fue necesario la creación de comités regionales del manejo integrado de cultivos en las regiones algodoneras cuando los primeros síntomas de virosis aparecieron al final de los ochentas; se detectaron al menos cinco tipos de virosis de los cuales uno estaba asociado con los geminivirus: virus del mosaico rizado del algodón (CNA 1990).

Durante los setentas se promovió el cultivo de melón (*Cucumis melo* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), convirtiéndose, hasta en la actualidad, en los mejores hospederos tanto del vector como de la expresión del virus. En el caso de melón, se detectó hasta un 57.7% de infección por geminivirus (Alvarado *et al.* 1991). Por varios años se creyó que la expansión del biotipo B en los cultivos de cucúrbitas

¹ Muerte celular

era el responsable de la incidencia de este virus. Sin embargo, en 1999 se detectó que éste representaba solamente un 8 % de los individuos positivos, el resto estaba representado por los biotipos nativos (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

En el monitoreo de 1999 se encontraron 14 diferentes patrones de ADN de geminivirus por medio de la técnica de SSCP. Aunque la variación representada por la secuenciación de algunos ejemplares no pareció correlacionar con algunos de los grupos al construir su filogenia. Sin embargo, se determinó que existe una gran variación genética y que muchas de éstas están asociadas dependiendo del tipo de plantación o biotipo del vector (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

3. Variabilidad del complejo *B. tabaci*. De los 19 biotipos pertenecientes a esta especie, se han registrado al menos seis en América, entre los cuales se conocen mayormente el biotipo A (conocido como originario en América), biotipo B (originario del Viejo Mundo) (Brown *et al.* 1995, Barro & Driver 1997) y muy recientemente el biotipo Q (originario del Mediterráneo). Muchos de los estudios realizados se han basado en la bioecología del tipo A y B, ya que son los que presentan mayor distribución y problemática a lo largo de los cultivos americanos (Hilje 2003).

Estudios previos determinaron al biotipo B como un grupo vector con mayor efecto virulento a comparación del A, lo que despertó con el tiempo la interrogante de las diferencias que podían presenciarse entre ambos (Costa & Brown 1991). Aunque anteriormente se creía que ambos pertenecían a la misma especie, estudios realizados para determinar la variabilidad por medio de la técnica de RAPD's (Random Amplified Polimorphic DNA), cálculos de distancia genética por medio de análisis de isoenzimas y la inhabilidad de demostrar fertilización de hembras en experimentos de cruces entre los dos biotipos, fueron las pautas necesarias para que algunos taxónomos separaran el biotipo B como la especie *Bemisia argetifolii* (Perring *et al.* 1993).

El biotipo B se diferencia del A en varias características bioecológicas: (i) tiene la capacidad de desarrollar en un adulto en tan solo tres semanas, la cual se completa por lo general en cultivos de tomate; (ii) ataca más tipos de cultivos; (iii) induce al menos cuatro alteraciones fitotóxicas en cucurbitáceas, tomate, brócoli y lechuga (Perring 1996); (iv) además de ser uno de los vectores más efectivos para transmitir *begomovirus* (Markham *et al.* 1996).

La adaptabilidad del biotipo B le ha permitido invadir áreas en los cuales el biotipo A no ha podido acoplarse, esto es, a mayores altitudes o latitudes, o por la disminución de temperatura en el ambiente (Brown 1994). Si se somete a períodos adversos puede incrementar su número poblacional de forma casi inmediata, debido a la alta tasa de fecundación (200 huevos / hembra cada 40 días, casi el doble del biotipo A) (Perring 1996; Bethke *et al.* 1991). Si no fuera suficiente, las hembras pueden originar varios machos reproduciéndose por partenogénesis (Byrne y Bellows 1991).

Ambos biotipos tienen un aumento poblacional durante la estación seca, ya que su potencial reproductivo puede expresarse mejor en rangos desde 20 a 30 °C (Gerling *et al.* 1986). Debido al aumento en la fecundidad, la habilidad como vector virulento aumenta considerablemente durante esta estación. Sin embargo, para transmitir el virus no se requiere gran cantidad de adultos, ya que se ha observado cultivos totalmente afectados en la estación lluviosa, aún con bajas poblaciones de mosca blanca (Hilje 2003).

B. tabaci ataca al menos 500 diferentes plantas (Greathead 1986), entre las cuales sobresalen las familias Compositae, Solanaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, Euphorbiaceae y Leguminosae. En América se ha reportado que atacan 27 tipos de cultivos y aproximadamente 50 especies de flora silvestre (entre ellas muchas pertenecientes a las familias mencionadas anteriormente) (Hilje 1995). El biotipo B puede atacar más cultivos que el A, entre ellos: el repollo, coliflor, brócoli, lechuga, cítricos y la papaya, aunque no puede completar su ciclo de vida en todos los cultivos o plantas silvestres, necesita regresar a cultivos como el de tomate (Perring 1996).

También existen otras poblaciones de *B. tabaci* que se han adaptado específicamente a un solo tipo de cultivo. En Puerto Rico se reportó la existencia de una raza cuyo ciclo de vida estaba totalmente restringida a *Jatropha gossypifolia* (L.). Esta raza, llamada “*Jatropha*” no se podía reproducir ni alimentar en la mayoría de otras plantas (Bird 1957). En contraste, la raza “*Sida*” fue detectada afectando varios tipos de cultivos excluyendo *J. gossypifolia* en el mismo país (Bird *et al.* 1971). Otros estudios demostraron que también existen otras poblaciones de *B. tabaci* en Brasil no colonizaron la yuca (*Manihot esculenta* (Crantz)), mientras que en África sí sirvió como planta hospedante (Costa y Russel 1975).

4. Los biotipos de mosca blanca en Guatemala. La mayoría de su detección se realizó por medio de proteínas esterasas no específicas marcadoras. Hasta ahora se reconocen al menos siete diferentes biotipos, de los cuales dos son provenientes del viejo mundo (B y Q). El grupo restante está representado por el biotipo nativo A y los diferentes fenotipos encontrados para el G. Sin embargo, muchos de éstos han presentado ambigüedad en la expresión de sus bandas, de modo que cabe la posibilidad que algunos biotipos considerados diferentes sean los mismos (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

a. Biotipo B. Este biotipo fue reportado por primera vez para Guatemala al final de los ochentas. Su aparición se cree proveniente del intercambio de material de la planta flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima*) con Estados Unidos, quien la importó anteriormente desde el viejo mundo (Costa y Brown 1991; Brown *et al.* 1991). En 1995 fue detectada únicamente en plantaciones de melón en el oriente a un intervalo de 190 a 290 m SNM (Krafka 1995). Sin embargo, en 1999 se reportó por primera vez en el sur, afectando ya no solamente plantaciones de melón. Aunque se detectó en nuevos cultivos, su incidencia nunca fue tan significativa como en las plantaciones de cucúrbitas; la incidencia sobre cucúrbitas en 1999, especialmente melón, fue de un 64 % en el oriente y un 71 % en el sur (Cuadro 2). Finalmente, a

pesar de que parece no representar una diferencia significativa de su incidencia entre estas dos regiones, sí existe un cambio gradual en el cambio de temporada; la región oriente tiene un 63% durante la estación después de las lluvias, mientras que el sur experimenta un aumento a 67% durante la estación inicio de las lluvias (Cuadro 3) (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

b. Biotipo A. No necesariamente un biotipo criollo de Guatemala, pero lo es para América como plaga derivada de las plantaciones de algodón (Costa y Brown 1990; Brown *et al.* 1991). Proliferó enormemente en Guatemala cuando surgió la explotación de cultivos de algodón durante los cincuenta y sesentas. Pero su incidencia disminuyó cuando las plantaciones de algodón decayeron al final de los años ochenta (CNA 1990). Solamente fue reportado con baja presencia para diferentes cultivos en el monitoreo de 1999, sin observar preferencia por alguno en específico (Cuadro 2) ni tampoco por cambio de temporada (Cuadro 3). Finalmente, sólo se logró detectar que estaban mayormente distribuido entre 201 a 400 m SNM y 801 a 1000 m SNM (Cuadro 3) (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

c. Biotipo Q. Originario de la región europea del Mediterráneo, ha sido asociado con problemas de control de plagas de mosca blanca debido a su capacidad de resistencia a muchos insecticidas. Este biotipo es inmune a IGR piriproxifeno (Distance), posee una susceptibilidad reducida a IGR buprofezina (Talus) y una sensibilidad reducida a los insecticidas neonicotinoides (Marathon o Merit), acetamiprid (TriStar) y timetoxam (Flagship) (Stansly, *et al.* 2005). Fue detectado por primera vez en plantas comerciales de pascuas, posiblemente provenientes de Guatemala y México, por las universidades de Arizona y California en marzo del 2005. Debido a que en Guatemala solamente se conoce un reporte sobre su detección, no se conoce si la misma ha logrado colonizar las diferentes áreas de la zona.

d. Biotipo G. Al final de los ochentas, fue descrito por primera vez como uno de los biotipos criollos de la región centroamericana (especialmente para Guatemala) (Brown *et al.* 1991; Brown y Bird 1995). Aunque actualmente se encuentra conformado de al menos cinco diferentes fenotipos, estos son agrupados para ser diferenciados de los que no son exclusivos de la región. En 1995 se reportaron los primeros dos fenotipos: G1 y G2. El biotipo G1 se encontraba entre 0 y 346 m SNM al sur en los municipios de Escuintla y Tiquisate; y el G2 entre 239 y 2310 m SNM en toda la región del país, preferentemente en cultivos de tabaco. Sin embargo, las limitaciones en el estudio no permitieron concluir si los biotipos B y G1 eran o no el mismo (Krafka 1995). En 1999 se reportaron cinco nuevos fenotipos, los cuales fueron nombrados con una numeración continua para evitar problemas de distinción (G3, G4, G5, G6 y G7, respectivamente). Se logró determinar que el biotipo G3 era comparable con el G1 y el biotipo G2 con el G6, con respecto a la interpretación de sus bandas o fenotipo. De igual forma se discutió la dificultad de discernir entre los biotipos G7 y A como también G4 y B, ya que se diferenciaban en tan solo la expresión de una banda. Esto fue explicado ya que las isoenzimas pueden presentar bandas extras cuando el individuo ha sido sometido a un ambiente de estrés. Sin embargo, se trataron como biotipos diferentes. Finalmente, se concluyó que la dinámica de éstos presentaba independencia con el tipo de cultivo, la

temporada y altura a lo largo del oriente y sur del país (Cuadro 2 y Cuadro 3) (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

Cuadro 2. Incidencia de biotipos de *B. tabaci* por región y por tipo de cultivo durante el monitoreo 1998 – 1999 en las regiones oriente y sur de Guatemala

Biotipo	Incidencia por Región		Incidencia por tipo de Cultivo									
	Oriente	Sur	Oriente					Sur				
			Tabaco	Cucúrbitas	Chile	Frijol	tomate	Tabaco	Cucúrbitas	Chile	Frijol	tomate
B	44%	56%	4%	64%	7%	10%	15%	12%	71%	2%	1%	14%
A	54%	46%	0%	33%	34%	9%	24%	19%	5%	21%	7%	4%
G7	69%	31%	10%	36%	19%	21%	14%	23%	37%	16%	16%	8%
G3	55%	45%	0%	40%	0%	60%	0%	0%	100%	0%	0%	0%
G4	80%	20%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%
G6	25%	75%	0%	18%	8%	24%	50%	50%	0%	0%	0%	50%
G5	76%	24%	3%	34%	42%	4%	17%	21%	34%	14%	15%	43%

Los datos fueron obtenidos de Orozco (1999) y Palmieri *et al.* (1999), modificados solamente en su forma de presentación.

1) Incidencia en diferentes cultivos: En el sur solamente los biotipos G3 y G4 presentaron una incidencia del 100% en plantaciones de cucúrbitas. En todos los demás biotipos se observó variabilidad, excepto el biotipo G6 que únicamente se observó en Tomate y Tabaco. En el oriente nuevamente G3 y G4 presentaron preferencia sobre cucúrbitas, aunque G3 también aumentó en plantaciones de frijol. Todos los demás nuevamente son variables sobre el resto de cultivos (Cuadro 2) (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

2) Incidencia en las diferentes temporadas: Las diferencias estudiadas en el monitoreo de 1999 se basaron en dos épocas anuales: al inicio de las lluvias y al final de las lluvias. Al inicio de la temporada de lluvias el sur se caracteriza por el aumento considerable del biotipo G6 (un 91%) sobre el oriente, aunque éste último tiene mayor incidencia en el resto de biotipos criollos. Sin embargo, el G4 no se encuentra en ninguno de los dos durante esta temporada. En la temporada de final de las lluvias la incidencia del biotipo G6 aumentó considerablemente en el oriente, sobrepasando a la reportada en la temporada anterior del sur. Aunque por lo general nuevamente el resto de biotipos presentó mayor incidencia en el oriente, solamente G3 presentó el 100% en el sur para esta temporada (Cuadro 3) (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

Cuadro 3. Incidencia de biotipos de *B. tabaci* por temporada e intervalos de altura durante el monitoreo 1998 – 1999 en las regiones oriente y sur de Guatemala.

Biotipo	Incidencia por Temporada				Incidencia por intervalo de Altura (m SNM)				
	Inicio Lluvia		Después Lluvia		0-200	201-400	401-600	801-1200	1201-1800
	Oriente	Sur	Oriente	Sur					
B	33%	67%	63%	38%	4%	40%	9%	3%	38%
A	57%	43%	53%	47%	0%	46%	0%	34%	0%
G7	86%	14%	56%	44%	0%	64%	3%	48%	4%
G3	60%	40%	0%	100%	0%	27%	18%	55%	0%
G4	0%	0%	80%	20%	0%	20%	0%	0%	80%
G6	9%	91%	60%	40%	0%	75%	0%	19%	17%
G5	55%	45%	90%	10%	7%	21%	4%	28%	14%

Los datos fueron obtenidos de Orozco (1999) y Palmieri *et al.* (1999), modificados solamente en su forma de presentación.

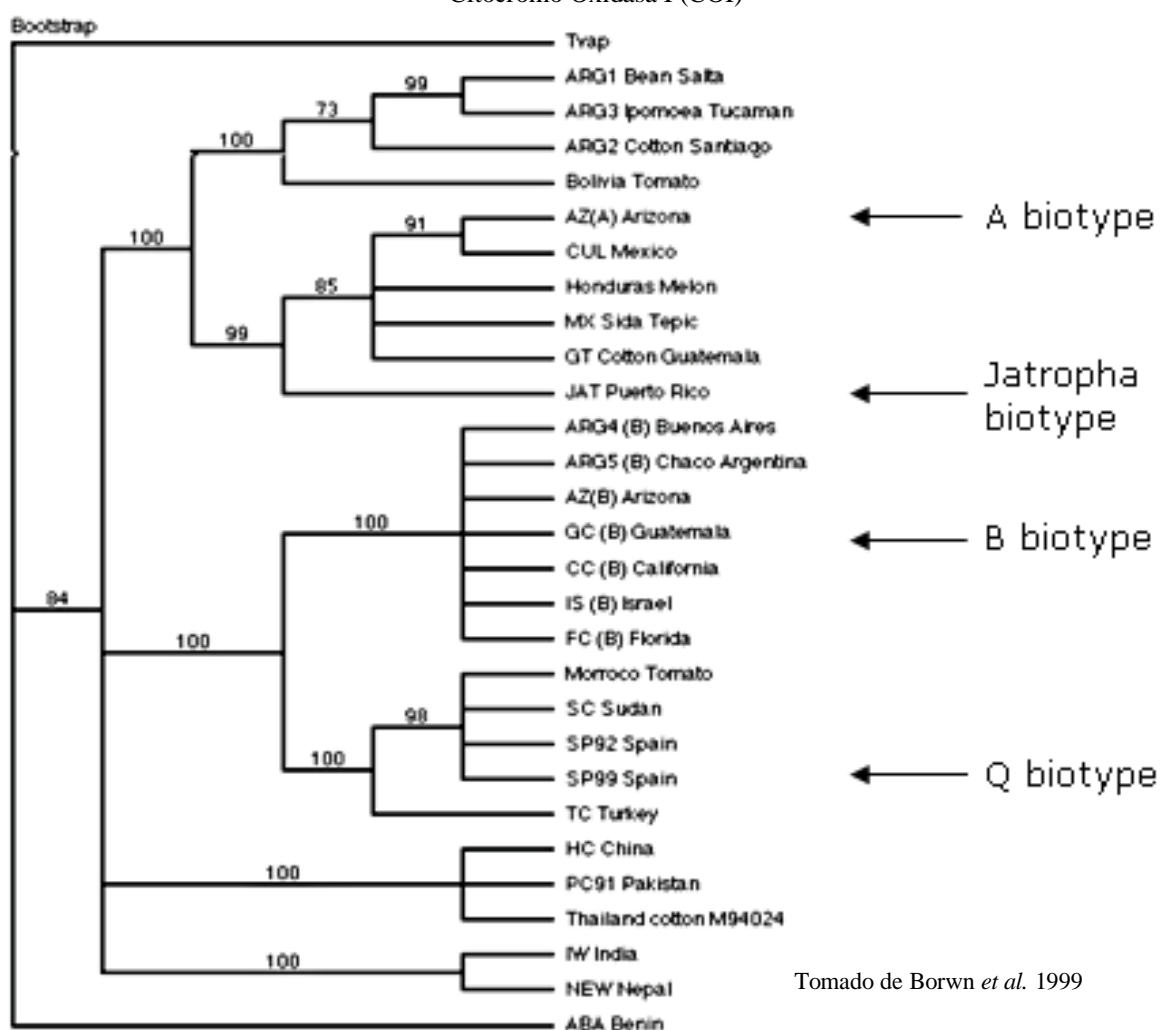
3) Incidencia en los diferentes intervalos de altura: Solamente el biotipo G4 estaba establecido hasta un 80% a partir de 1201 a 1800 m SNM. El resto presentó variabilidad con respecto a su incidencia en las diferentes alturas, de modo que podría explicar la falta de correlación entre la variable biotipo y la altura. Sin embargo, algunas biotipos se establecen en alturas en las cuales son mayormente detectados (Cuadro 3) (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

5. Estudios bioquímicos y moleculares. Ya desde mediados de los ochentas se comenzó a demostrar la gran variabilidad dentro de las poblaciones de *B. tabaci*. Estas evidencias incluyen pruebas de separación proteica por electroforesis para la identificación de poblaciones monomórficas en al menos 12 esterasas (Costa *et al.* 1993; Brown *et al.* 1995), patrones polimórficos de la técnica de RAPD's (Barro y Driver 1997) y estudios que involucran diferencias de las poblaciones en la transmisión de geminivirus en hospederos tanto experimentales como naturales. Se han realizado estudios de cruzamiento entre individuos de diferentes biotipos, pero los resultados son muy difíciles de obtener o simplemente son muy ambiguos (Costa *et al.* 1993) al igual que los de microscopía (Bush 1994).

Hasta ahora el campo de la biología molecular no ha sido muy explotado para aumentar el conocimiento acerca de la bioecología de estos organismos. Entre los primeros estudios realizados se utilizó el gen ribosomal 18S como marcador para diferenciar varias especies del orden Homóptera. En el mismo solamente se logró demostrar una diferencia de tan sólo una base entre los biotipos A y B de *B. tabaci* (Campbell *et al.* 1994). Al final del siglo pasado se reportó la clonación y secuenciación de dos marcadores mitocondriales (porción del gen ribosomal 16S y el gen COI) en diez diferentes poblaciones de *B. tabaci*

colectadas a nivel mundial. Sus resultados les permitieron concluir que el biotipo B era una introducción del viejo mundo, al construir mapas filogenéticos demostrando que el mismo estaba mucho más relacionado con las poblaciones de Israel y Yemen que las del biotipo A en el nuevo mundo (Brown *et al.* 1999, ver Figura 3). En la misma, también se observa el biotipo Q, el cual está mayormente relacionado al biotipo B dado a que ambos se originaron en el viejo continente; sin embargo, la mayoría de detecciones para el biotipo Q están en los alrededores del Mediterráneo (España, Turquía y Sudán) (Brown *et al.* 1999). A diferencia del biotipo B, no existían secuencias detectadas del biotipo Q para el continente americano en el año 1999.

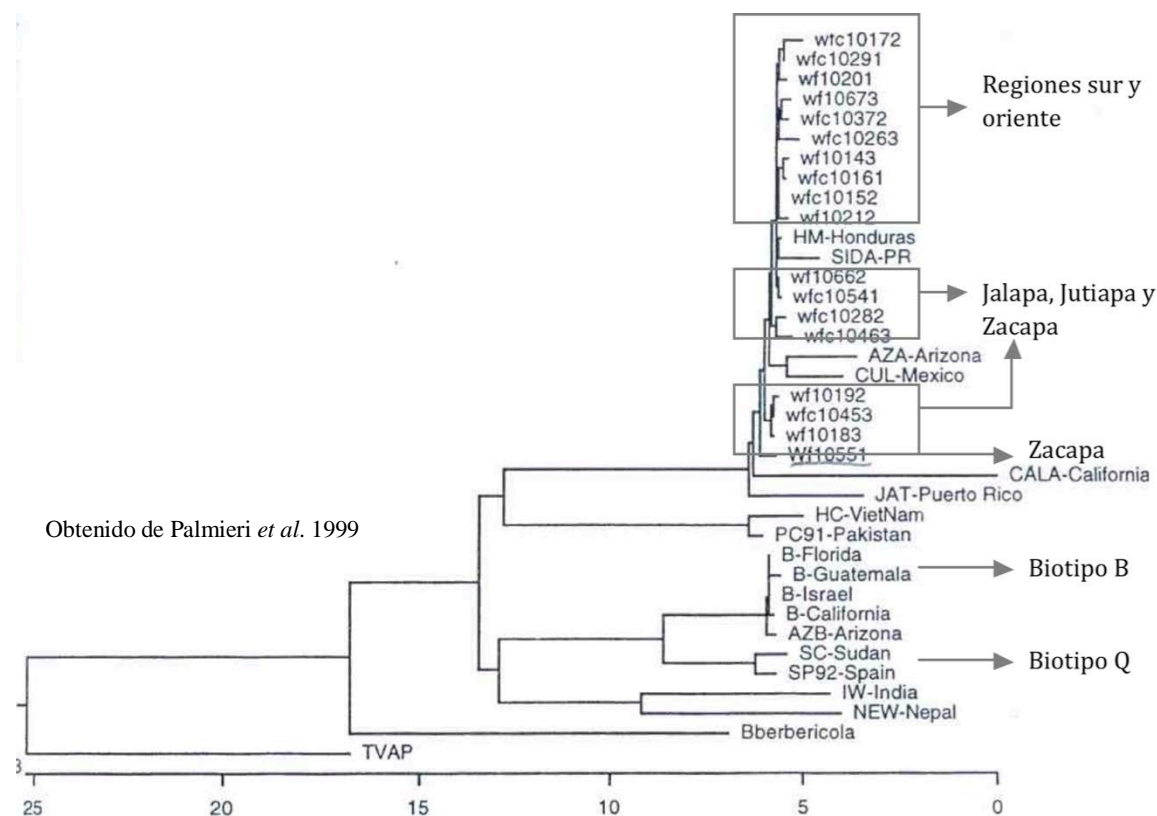
Figura 3. Análisis filogeográfico del complejo de biotipos de *B. tabaci* a nivel global utilizando el gen Citocromo Oxidasa I (COI)



En 1999 se utilizó por primera vez el gen COI para determinar la variabilidad genética en mosca blanca para Guatemala (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999). En la Figura 4 se muestra en la parte superior las

secuencias de ADN de mosca blanca analizadas para Guatemala, solamente la del biotipo B está situada en la parte inferior.

Figura 4. Árbol filogenético de *B. tabaci* en base al marcador COI mitocondrial, monitoreo de mosca blanca en la región oriente y sur de Guatemala 1998 – 1999



Las secuencias de Guatemala comienzan luego de la división de la raza *Jatropha* de Puerto Rico, separándose del resto que pertenecen al viejo mundo. La primera secuencia que se ramifica (No. 10551) se detectó en Zacapa en una plantación de tomate; esta secuencia al parecer presentó mayor diferencia que el resto de secuencias de Guatemala. El resto de secuencias vuelven a subdividir en tres diferentes secuencias, justo antes de la rama representada por Arizona, México y otro subgrupo de muestras de Guatemala, Honduras y Puerto Rico. Todas estas secuencias pertenecientes a departamentos del oriente de Guatemala, entre ellos Zacapa, Jalapa y Jutiapa. El resto de secuencias fueron encontradas en ambas regiones, pero al parecer compartían una diversidad genética muy parecida (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

La comparación filogenética permitió la observación de la diversidad que posee *B. tabaci* en Guatemala, principalmente en los individuos secuenciados del oriente. Sin embargo, no se logró determinar con claridad el distanciamiento genético (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999).

B. Justificación

Actualmente Guatemala pertenece a uno de los países afectados por la constante invasión de la mosca blanca en el sector agropecuario, debido al aumento de problemas en sus efectos de transmisión virulenta y síntomas. Tal efecto es de muy alta preocupación ya que la mayoría del país se maneja en base a la producción agropecuaria, por lo que las miles de pérdidas en cultivos equivale a un desequilibrio total en la economía del mismo. Cualquier aporte al conocimiento de la bioecología de los diferentes biotipos que afectan, no solamente a nivel nacional sino mundial, podría contribuir en un futuro al conocimiento integrado de manejo de plagas para manejar adecuadamente esta invasión.

La explotación de áreas en el campo de biología molecular permitirá una nueva visión para ampliar el conocimiento de la evolución y la ecología de las mismas. A pesar de que ya se han realizado estudios utilizando marcadores mitocondriales para verificar polimorfismos en diferentes países, en Guatemala se necesita hacer un estudio más amplio de sus poblaciones de mosca blanca en este caso utilizando el gen COI para poder aclarar aspectos que en estudios anteriores no quedaron claros. Estudios anteriores demostraron que el nivel polimórfico presentado por el gen COI como marcador molecular puede servir como indicador potencial para el estudio evolutivo y ecológico del complejo *B. tabaci* (Frohlich *et al.* 1999). Aspectos como la ambigüedad actual para poder determinar entre los diferentes biotipos a nivel regional son pautas clave para buscar nuevas metodologías como las descritas anteriormente.

C. Objetivos

1. General

- a. Elaboración de la filogenia de los biotipos de *B. tabaci* que están presentes en las diferentes regiones de Guatemala.

2. Específicos

- a. Elaboración de un protocolo para la detección de los biotipos de mosca blanca presentes en Guatemala utilizando marcadores moleculares de ácidos nucleicos.
- b. Determinación de su distribución geográfica.
- c. Observación del polimorfismo presente en el gen COI para los diferentes biotipos de mosca blanca.
- d. Determinación de la asociación existente entre el biotipo y las variables de altitud, región, tipo de cultivo y temporada.

D. Hipótesis

Existe asociación entre la variable independiente biotipo con las variables dependientes región, altura, tipo de cultivo y temporada (seca y después de las lluvias).

1. Asociación entre biotipo y región.

Ho = No existe asociación entre la variable biotipo y región de Guatemala 2006 -2008.

Ha = existe asociación entre la variable biotipo y región de Guatemala 2006-2008.

2. Asociación entre biotipo e intervalo de altura.

Ho = No existe asociación entre la variable biotipo y altura de Guatemala 2006 -2008.

Ha = existe asociación entre la variable biotipo y altura de Guatemala 2006-2008.

3. Asociación entre biotipo y tipo de cultivo.

Ho = No existe asociación entre la variable biotipo y cultivo de Guatemala 2006-2008.

Ha = existe asociación entre la variable biotipo y altura de Guatemala 2006-2008.

4. Asociación entre biotipo y temporada

Ho = No existe asociación entre la variable biotipo y la temporada de colecta en Guatemala 2006-2008.

Ha = existe asociación entre la variable biotipo y la temporada de colecta en Guatemala 2006-2008.

II. MÉTODOS

Las prácticas se realizaron en el laboratorio de virología del departamento de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala, y el laboratorio del departamento de “*Plant Sciences*” de la Universidad de Arizona. Se obtuvo ayuda de diferentes personas pertenecientes al MAGA, para localizar zonas de cultivos en varios departamentos a lo largo de todas las regiones de Guatemala (sur, norte, centro, oriente y occidente).

El estudio se llevó a cabo durante un año, sin embargo se ingresaron muestras colectadas desde inicios del año 2006 que permitieron realizar comparaciones con los dos años más recientes. Las principales fechas de colecta fueron: temporada seca 2006 y 2007 (marzo – abril), temporada después de la lluvia 2006 y 2007 (noviembre y diciembre) y la temporada seca del 2008 en dos fechas de colecta: a) 29 a 30 de marzo y 05 a 15 de mayo. Solamente la colecta de la temporada seca de 2008 está representada por todas las regiones de Guatemala. Las colectas en 2006 y 2007 fueron realizadas sólo en el oriente, sur y central.

Se colectó en la mayoría de departamentos de Guatemala, con el objetivo de que todas las regiones entraran en el análisis de la distribución de los biotipos. En cada región se localizaron diferentes familias de cultivos, entre ellos: tomate, chile, tabaco, melón, ayote, sandía, güicoy, okra, frijol, papaya y algunas malezas. Sin embargo, fue complicado encontrar todas en una misma región.

A. Recolección de mosca blanca

Las visitas a los cultivos se realizaron a partir de las 9:00 am, ya que las moscas eran muy difíciles de coleccionar en horas muy tempranas. Las moscas tienden a evadir el sol, por lo que en la tarde las adultas se restringen a no moverse y permanecer en el envés de las hojas (Cabello *et al.* 1996).

Antes de realizar la colecta, se apuntó datos de localidad, fecha, latitud, longitud, tipo de cultivo y observaciones con respecto al número correlativo de muestreo. En el apéndice A se puede apreciar el formato utilizado.

Dependiendo de qué tan abundante eran las moscas, se seleccionaron las hojas más jóvenes de diez plántulas al azar. Sin embargo, algunos cultivos contenían baja abundancia, por lo que fue necesario aumentar el esfuerzo de revisión en un lapso no mayor a una hora por cultivo. Las moscas se aspiraron hacia un contenedor de vidrio, frotando suavemente la boquilla del aspirador contra la superficie del envés de la hoja. Se transportaron en etanol al 80% al laboratorio de virología de la Universidad del Valle de Guatemala, y finalmente fueron almacenadas en frío (4° C) previo a ser clasificadas.

B. Selección del número y estrategia de muestreo

Para estimar el tamaño total de la muestra, se utilizó una primera fórmula cuyo intervalo de confianza está determinado por la estimación puntual (p_o) y por la amplitud o anchura de dicho intervalo, denominada precisión (d) (Fuentelsaz 2004).

$$d = Z_{\alpha} \sqrt{\frac{p_o \times q_o}{n}} \quad (1)$$

Despejando n , se obtuvo la segunda fórmula para calcular el número de observaciones o individuos necesarios para estimar una proporción (Fuentelsaz 2004):

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \times p_o \times q_o}{d^2} \quad (2)$$

Por tanto, es evidente que las variables que deben ser proporcionadas por el investigador son la precisión y la confianza o seguridad establecida ($1-\alpha$). Finalmente, el valor p debe ser extraído de la literatura o de una prueba piloto (Fuentelsaz 2004).

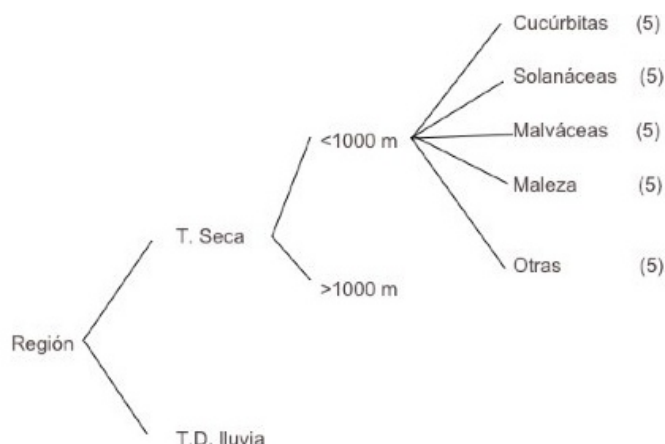
Para el cálculo del tamaño de muestreo de la colecta de mosca blanca de Guatemala durante 2006 a 2008, se utilizó un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$; $Z_{\alpha} = 1.96$), un error máximo admitido del 7% y un valor de prevalencia calculado por el porcentaje total de *B. tabaci* colectado (53.65%, ver Figura 8).

$$n = \frac{(1.96)^2 \times (0.5365) \times (1 - 0.5365)^2}{(0.07)^2} = 194.955516 \approx 195$$

Además, también debe tenerse en cuenta el tipo de muestreo a utilizar. Casi todas las fórmulas que se utilizan asumen que el muestreo es aleatorio, es decir, que todos los sujetos tienen la misma probabilidad de formar parte del estudio. Si el muestreo no es aleatorio, se tiene en cuenta el llamado “efecto de diseño”, por lo que se ha de multiplicar el valor calculado por un número entero entre 1.5 y 3. En este estudio se utilizó un muestreo aleatorio estratificado, por lo que es aconsejable duplicar el número de muestras para obtener los mismos resultados que en un muestreo aleatorio (Fuentelsaz 2004). En este caso un total de 390 individuos de *B. tabaci*.

Para la selección de la muestra, se estratificó la población en subgrupos que incluyeran moscas de los diferentes tipos de cultivos, intervalos de altura, en cada una de las regiones por temporada y por año. Se debe recordar que el proyecto cuenta con muestreos desde inicios del 2006, lo cual implica tres años hasta la temporada seca del 2008. Siguiendo el esquema que se muestra en la Figura 5, se seleccionaron cinco muestras de mosca al azar por familia o tipo de cultivo, 25 muestras por el intervalo de altura (mayor o menor a 1000 m SNM), 50 muestras por el tipo de temporada seca o después de la lluvia, dando un total de 100 muestras por año. Un total de al menos 300 muestras analizadas entre los tres años. Sin embargo, se trataron los 390 individuos propuestos en el tamaño de muestra para solventar las varias limitaciones que ocurrieron mencionadas más adelante en resultados y discusión.

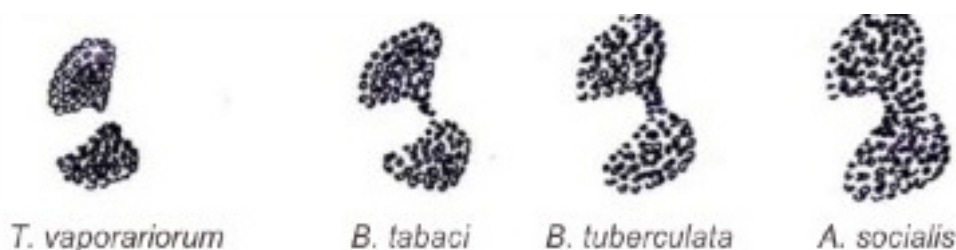
Figura 5. Esquema de demostración de selección de muestras de *B. tabaci* por región, temporada, altura y familia de cultivo.



C. Clasificación de mosca blanca

Las moscas se clasificaron a nivel de especie y género. Se seleccionó como criterio principal la posición de los omatidios en la cabeza (si están juntos a través de un omatidio, se consideró *B. tabaci*; si están separados, *T. vaporariorum*). Otras especies de mosca blanca en Guatemala también son fáciles de confundir con *B. tabaci*, por lo que se recurrió a la Figura 6 para poder discernir. Sin embargo, existen muchas otras que no han sido clasificadas actualmente, pero sus características morfológicas son mucho más obvias de distinguir.

Figura 6. Posición de omatidios en la cabeza de algunas de las especies de mosca blanca más comunes para Guatemala.



Se seleccionaron únicamente las hembras de *B. tabaci* por dos razones: 1) presentan diploidía¹ y 2) el gen CO1 es hereditario por vía materna. Para discernir entre sexo se utilizó como indicador el segmento final del abdomen (Figura 7). Si el abdomen era abultado con su segmento final en forma de gancho, se consideró hembra. Si el mismo era de forma más delgada y cuyo segmento final en forma de tijera, macho.

Figura 7. Distinción entre géneros de mosca blanca utilizando como criterio la forma y el segmento final del abdomen.



¹ Organismo que presenta dos juegos de cromosomas (2n)

D. Protocolos moleculares para detección del gen CO1 mitocondrial

Cada mosca individual fue macerada con la solución amortiguadora de lisis para extraer los ácidos nucleicos (Apéndice B). A cada una se le corrió una PCR para detectar el gen CO1 utilizando un termociclador (Mastercycler personal Eppendorf), el cual contiene una extensión aproximada de 1000 pb dentro del ADN mitocondrial. Para ello, se utilizó una mezcla de reactivos específicos (Apéndice C) con los cebadores Mtd10 y Mtd12 (Invitrogen), cuyas secuencias aparecen en el mismo apéndice. Se corroboró la amplificación por medio de geles de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio marca Sigma (Apéndice D), utilizando una cámara de electroforesis horizontal marca Sigma. Solamente las muestras positivas se guardaron a 20° C bajo cero para posteriores protocolos.

Se realizó un protocolo para detectar la conformación del polimorfismo del gen CO1 mediante la técnica SSCP's, utilizando muestras de biotipos A y B como controles, además de un marcador de 0.12 – 23.1 Kbp marca Roche para determinar el peso de las bandas. Las muestras fueron desnaturalizadas con solución de carga y calor previo a ser corridas en geles de poliacrilamida marca Merk al 10% (Apéndice E), utilizando una cámara de electroforesis vertical modelo Mini Protean III marca Biorad. Finalmente, las bandas se revelaron con tinción de nitrato de plata marca Sigma (Apéndice F) y fueron deshidratadas con calor para preservar los geles (Apéndice G).

Para conocer el peso molecular de cada banda, se midió con una regla la distancia que migraron a partir del pozo en que fue colocado el marcador (el cero exactamente sobre el inicio del gel). Esta distancia, convertida en milímetros, se utilizó para calcular la constante R_f de cada una de sus bandas. Luego, se graficó el logaritmo del peso molecular de cada banda del marcador contra su R_f , mediante una regresión lineal simple. El resto de bandas con pesos moleculares desconocidos, se calcularon en base a la fórmula construida por medio del análisis estadístico y el cálculo de su constante R_f .

Todas las muestras que presentaron un patrón diferente en la migración de sus bandas fueron consideradas como un polimorfismo diferente. Estas muestras se amplificaron de nuevo y se mandaron a secuenciar a la Universidad de Arizona en Estados Unidos. Las especificaciones generales de todo el equipo, material, reactivos, entre otros, se encuentra adjuntado en el Apéndice H.

E. Análisis filogenético

Se utilizó el *software* DNA Star Lasergene versión 8.0 para editar, alinear y crear el árbol filogenético. Para editarlas, primero se localizó el área que distingue los biotipos del nuevo y viejo mundo en cada una de las diferentes secuencias; esta área se encontró después del área de unión de los cebadores. Si la secuencia contenía las bases ATCTTCAT se consideró del nuevo mundo, y si era GTTTTCAT del viejo

mundo. Finalmente fueron empalmadas a un total de 780 pb a partir del área de diferenciación, previamente a ser alineadas y construir su árbol filogenético.

Se utilizaron varias secuencias de otros biotipos, razas, e inclusive especies relacionadas para construir el árbol filogenético: *T. vaporiorum* como el grupo exterior; biotipos B de la especie *B. tabaci* provenientes de Arizona y Guatemala, y biotipo Q de España como el grupo del viejo mundo; y el biotipo A, razas *sida* y *jatropha* de Puerto Rico, y una raza de Honduras como grupo del nuevo mundo. Todas ellas obtenidas de la base de datos de la Dra. Judith K. Brown de la Universidad de Arizona, para observar de mejor forma la agrupación de los biotipos detectados en Guatemala.

F. Análisis de datos

Se elaboraron cuadros de contingencia para comparar la distribución actual de polimorfismos (o biotipos) con la de la región, tipo de cultivo y diferencia de temporada (seca y después de las lluvias respectivamente). Se calculó el valor χ^2 experimental utilizando un alfa de 0.05 y se comparó con los valores críticos de probabilidad para determinar si existía dependencia, utilizando el *software* estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, por sus siglas en inglés). Las hipótesis nulas (H_0) fueron construidas como la falta de asociación entre la variable biotipo y cualquiera de las que se expusieron anteriormente. Finalmente, las alternativas (H_a) en su contraparte, demostrarían la existencia de asociación (ver sección de Hipótesis en introducción).

III. RESULTADOS

A. Abundancia de mosca blanca

En el Apéndice I se presentan los resultados generales con respecto a la identificación de los individuos de mosca blanca capturados. En la Figura 8 se observa que ocurrió mayor colecta de *B. tabaci*, sobre cualquier otra especie de mosca blanca (53.65%). La segunda especie más abundante fue *T. vaporariorum* con 29.75%. El resto se encontraron en porcentajes menores al 15%.

En la Figura 9 se muestran las especies de mosca blanca clasificadas, cinco hasta el nivel de especie y otra categoría denominada como no identificada, siendo *B. tabaci* dominante en el oriente, centro y norte. *Bemisia tuberculata* presentó mayor dominancia en el sur, aunque *B. tabaci* también fue detectada en un 20.94%. *T. vaporariorum* se presentó en tres regiones, de las cuales en el occidente se observó en un 100%. Otras especies tales como *Trialeurodes abutilonea* y *Aleurotrachelus socialis* fueron muy poco frecuentes, sin embargo sus detecciones fueron mayormente en el norte y oriente. Finalmente la abundancia de mosca blanca no identificada presentó mayor distribución en el sur.

Figura 8. Porcentaje de abundancia de las especies de mosca blanca capturadas en Guatemala para el presente estudio (2006 – 2008).

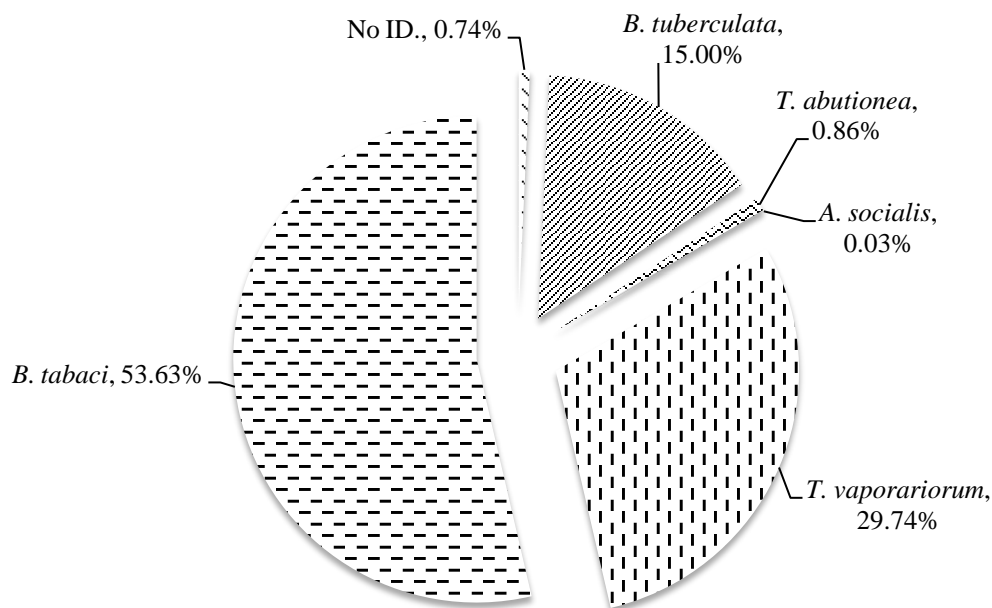
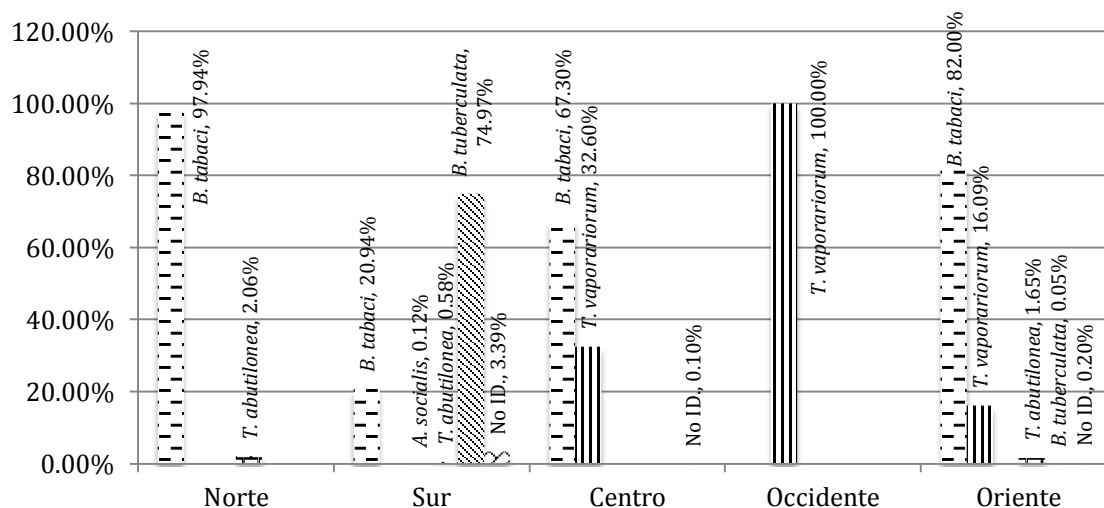


Figura 9. Porcentaje de abundancia de las especies de mosca blanca capturadas en las diferentes regiones de Guatemala para el presente estudio (2006 – 2008).



B. Secuenciación y análisis filogenético

Se extrajo un total de 390 muestras de ADN de mosca blanca de forma individual, de las cuales se lograron amplificar 297 para el gen CO1: 104 individuos del 2006, 92 del 2007 y 101 del 2008. El aumento de 90 moscas más sobre el total de 300 especificado en la metodología, se debe a que no todos los individuos presentaron la banda de amplificación.

El polimorfismo del gen CO1 de *B. tabaci* para Guatemala está representado en la delección, sustitución e ingresión de nucleótidos en nueve diferentes regiones; sin embargo, a partir de las mismas se detectaron siete diferentes secuencias (ver Cuadro 4). Todas se caracterizan por presentar el patrón de iniciación americano (ATCTCTCAT), de modo que se les asignó un número correlativo anteponiendo la letra G (para designarlos como biotipos o razas de Guatemala). Todas presentan un porcentaje de similitud mayor al 98.98 %, excepto las secuencias obtenidas de la base de datos de la Dra. Judith Brown, los cuales son más bajos, pero ninguno es nativo de Guatemala (ver

Cuadro 5). A continuación, se realizó un empalme a 780 pb de las secuencias para unificarlas a un mismo número de pares de bases; esto es muy importante, ya que el análisis filogenético se calcula en base a la diferenciación y número de nucleótidos. Luego, también se observó que éstas contenían las regiones principales en donde existía el polimorfismo (ver Apéndice J), el cual se utilizó para definir los biotipos de todas las muestras secuenciadas (ver Apéndice K). Finalmente, el patrón inicial del viejo mundo

(GTTTCTCAT) no se encontró en ninguna de las muestras secuenciadas, por lo que los biotipos B y Q no se reportaron para Guatemala en las muestras seleccionadas del intervalo de años 2006 – 2008.

Cuadro 4. Polimorfismos registrados para las secuencias del gen COI de los diferentes biotipos de *B. tabaci*

Biotipo	Sustituciones				Deleciones	Ingresiones
	A	C	G	T		
G1	0	0	0	0	0	0
G2	0	0	0	0	G (558)	T (792)
G3	0	0	A (415)	0	G (558)	T (792)
G4.1	0	0	A (696)	0	T (771)	T (792)
G4.2	0	0	0	0	T (771)	T (792)
G5	0	T (574, 587)	A (415)	C (52 y 115)	0	0
G6	0	T (574, 587)	A (415)	C (52 y 115)	G (558)	T (792)

A: Adenina; T: Timina; C: Citosina; G: Guanina. La letra fuera del paréntesis indica la base por la cual ha ocurrido una sustitución, delección o ingesión. El número dentro del paréntesis indica la posición en la secuencia en la cual ha ocurrido dicha mutación.

Cuadro 5. Matriz de porcentaje de similitud y distanciamiento de nucleótidos de las diferentes secuencias de mosca blanca en el proceso de secuenciación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
G1	1	2	3	2	3	5	6	7	15	21	48	59	123	120	118	238
G4.2	2	99.74	1	2	3	7	8	7	17	21	48	61	125	122	120	238
G4.1	3	99.62	99.87	3	4	8	9	8	18	22	49	62	124	121	119	238
G2	4	99.74	99.74	99.62	1	7	8	5	17	21	48	61	125	122	120	238
G3	5	99.62	99.62	99.49	99.87	6	7	4	16	20	47	60	124	121	119	237
G5	6	99.36	99.10	98.98	99.10	99.23	1	2	11	19	45	56	123	120	118	236
Honduras	7	99.23	98.98	98.85	98.98	99.10	99.87	3	12	20	45	55	124	121	119	237
G6	8	99.10	99.10	98.98	99.36	99.49	99.74	99.62	13	19	45	58	125	122	120	236
Tapachula Sida	9	98.08	97.83	97.70	97.83	97.95	98.59	98.46	98.34	29	56	67	130	127	124	244
Puerto Rico Jatropa	10	97.31	97.31	97.18	97.31	97.44	97.57	97.44	97.57	96.29	60	66	122	125	127	234
MEXICO	11	94.00	94.00	93.88	94.00	94.12	94.38	94.38	94.38	93.01	92.50	49	157	156	153	253
Arizona (A)	12	92.59	92.35	92.22	92.35	92.47	92.96	93.08	92.72	91.59	91.71	93.88	154	160	162	258
Arizona (B)	13	84.23	83.99	84.12	83.99	84.12	84.23	84.10	83.99	83.35	84.36	80.38	80.53	11	51	231
GUATEMALA (B)	14	84.64	84.40	84.53	84.40	84.53	84.64	84.51	84.40	83.76	84.02	80.52	79.90	98.59	48	231
España (Q)	15	84.87	84.64	84.76	84.64	84.76	84.87	84.74	84.64	84.12	83.74	80.88	79.65	93.46	93.85	234
T. vaporariorum	16	69.95	69.95	69.95	69.95	70.08	70.20	70.08	70.20	69.23	70.45	68.41	67.71	70.83	70.87	70.45

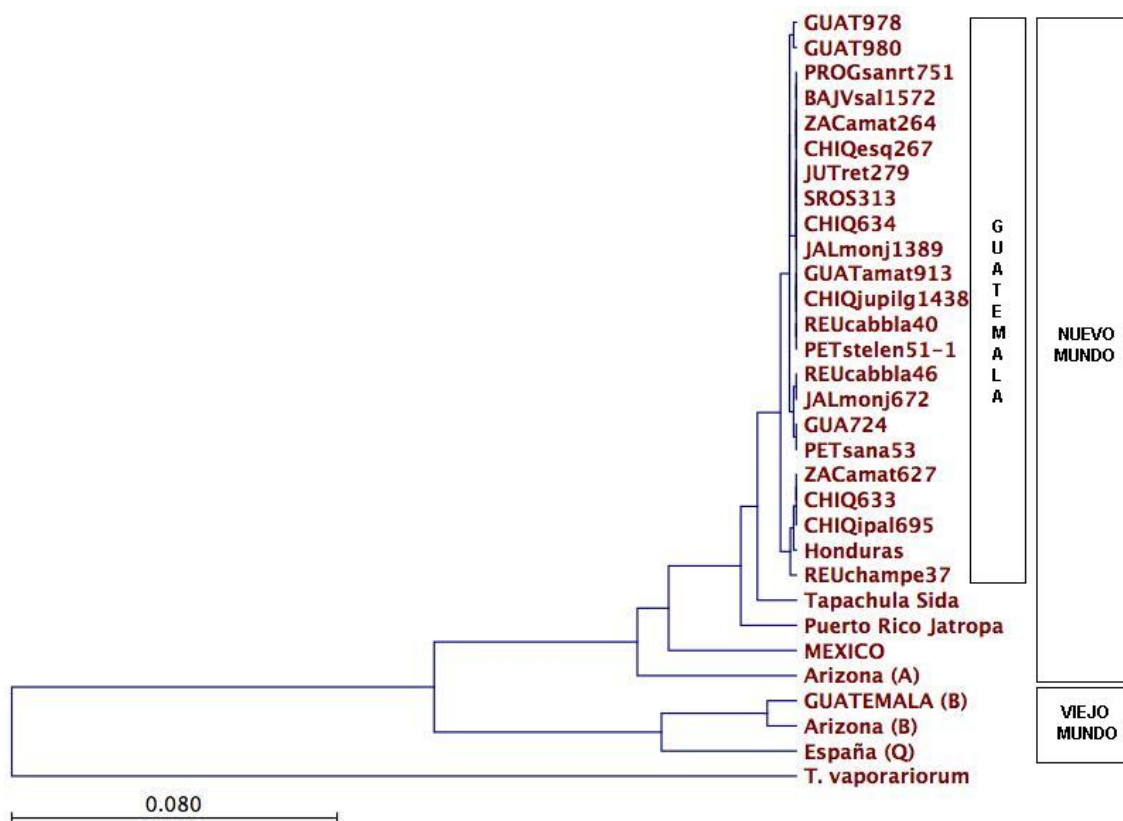
Todos las secuencias de los números uno a quince pertenecen a diferentes biotipos de la especie *B. tabaci*, la secuencia número dieciséis pertenece a la especie *T. vaporariorum*.

El análisis filogenético, Figura 10, se representó mediante el distanciamiento por el número de bases diferentes entre cada secuencia ingresada (análisis de parsimonia). Observe que la especie *T. vaporariorum* se utilizó como *outgroup*², ya que contiene el mayor número de bases diferentes y el menor porcentaje de

² Es un individuo o grupo de individuos que sirven como referencia para determinar las relaciones evolutivas de dos o más grupos de interés. Los organismos *outgroup* deben presentar un distanciamiento genético más elevado que los grupos de interés.

similitud con el resto. Luego, la especie *B. tabaci* se divide en dos principales clados³: Los biotipos del nuevo mundo y los del viejo mundo. El clado del viejo mundo desglosa el distanciamiento de los biotipos B y Q, pero ninguno perteneciente a los detectados para Guatemala en el actual estudio. El clado del nuevo mundo se separa en diferentes grupos, iniciando primero por el biotipo A, entre otras razas americanas más cercanas a Guatemala. Finalmente en la parte superior se separan los diferentes grupos que conforman la diversidad de *B. tabaci* en Guatemala, pero no se observa con mayor detalle el distanciamiento entre los mismos.

Figura 10. Análisis filogenético del gen CO1 de *B. tabaci* para Guatemala 2006 - 2008.



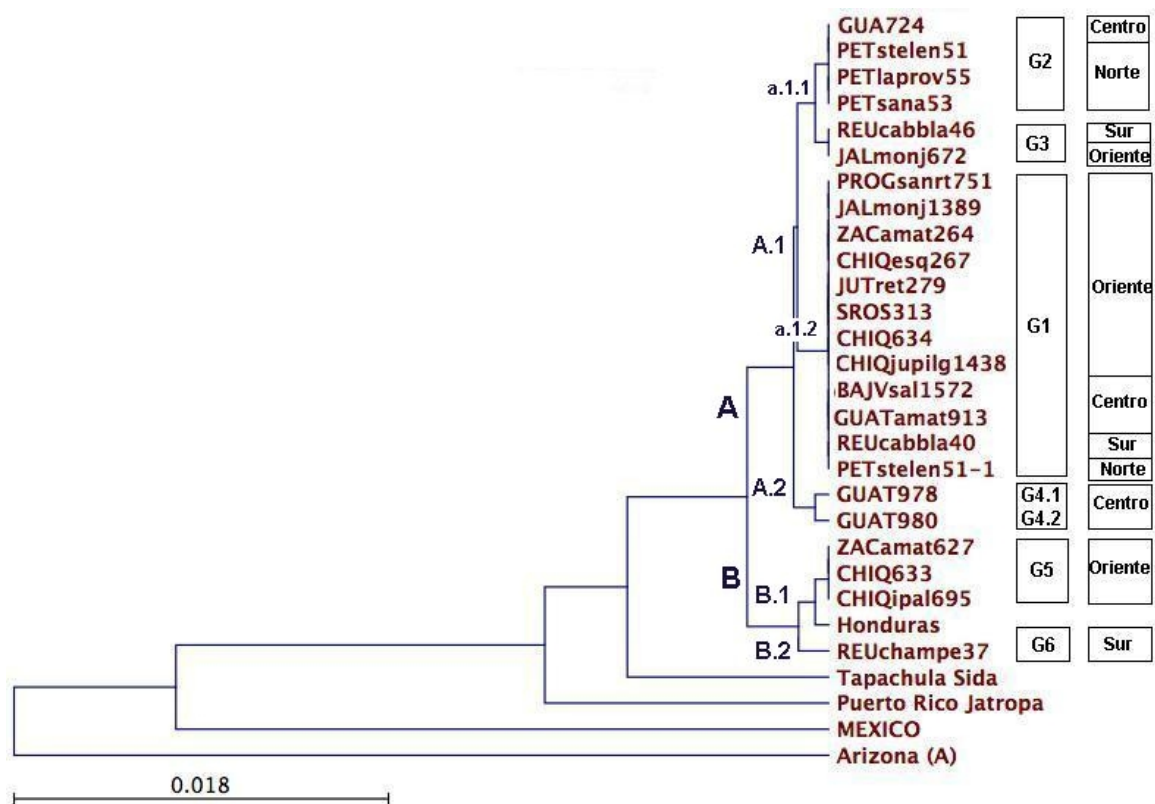
GUAT: Guatemala, PROG: El Progreso, BAJV: Baja Verapaz, ZAC: Zacapa, CHIQ: Chiquimula, JUT: Jutiapa, SROS: Santa Rosa, REU: Retalhuleu, PET: Petén.

En la Figura 11 se desglosa únicamente el clado del nuevo mundo para interpretar de mejor manera el distanciamiento de los grupos formados en Guatemala. Observe que al igual que se forman nuevos clados también existen varios grupos hermanos dentro de los mismos. La primera bifurcación está delimitada por el clado B, que se divide a su vez en dos sub grupos hermanos: B.2 que contiene el biotipo designado G6 solamente en el sur de Guatemala, y B.1 con secuencias características de G5 en el Valle del Motagua e

³ Refiere a cada una de las ramas propuestas en un análisis filogenético para agrupar a los seres vivos; en este caso, a los diferentes biotipos de mosca blanca.

Ipala en oriente. El clado A se subdivide inicialmente en los grupos A.2 que contienen secuencias de la región central (G4.1 y G4.2), mientras que el A.1 presenta una distribución mucho más amplia. Este último grupo se subdivide nuevamente en dos grupos hermanos: el a.1.2 que se encontró en todas las regiones en donde se detectó *B. tabaci*, pero mayoritariamente en la oriental (designado G1). Finalmente el grupo a.1.1 presenta dos sub grupos: el superior con secuencias principalmente de la zona norte en Petén y una secuencia en la zona centro en Guatemala (designado G2); el inferior con secuencias de la zona sur en Retalhuleu y oriente en Jalapa (designado G3).

Figura 11. Análisis filogenético del gen COI del clado americano de *B. tabaci* para Guatemala 2006 - 2008



GUAT: Guatemala, PROG: El Progreso, BAJV: Baja Verapaz, ZAC: Zacapa, CHIQ: Chiquimula, JUT: Jutiapa, SROS: Santa Rosa, REU: Retalhuleu, PET: Petén

C. Protocolo SSCP's del gen COI de *B. tabaci*

En la Figura 12 se presenta la migración electroforética de las diferentes bandas visualizadas durante la elaboración del presente protocolo. Dentro del mismo se observan los pesos (en pares de bases) conocidos para las bandas de la escalera molecular utilizada y los pesos estimados para las bandas de los biotipos patrones y nativos de Guatemala. Para estimar los pesos moleculares de las bandas de los biotipos de *B. tabaci* se calculó la constante R_f de cada banda del marcador molecular, luego cada valor R_f se graficó con sus respectivos pesos moleculares de cada banda (valor logarítmico). Se utilizó un modelo lineal, el cual

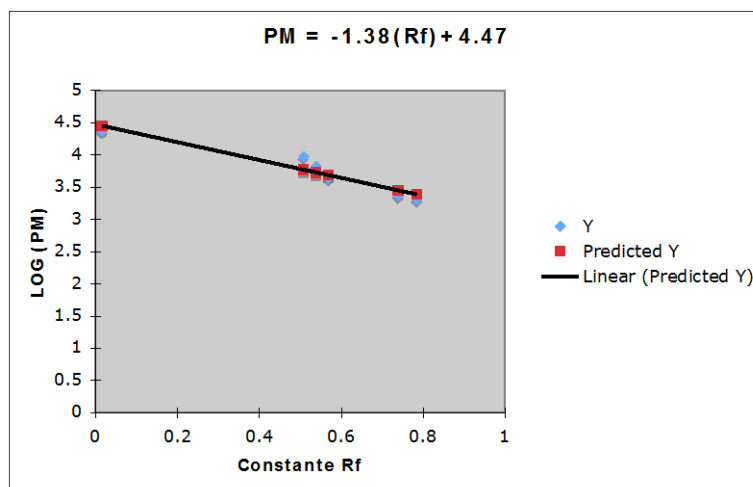
presentó un ajuste aceptable (r^2 : 0.91), con pendiente negativa y un error estándar del 13% (ver Cuadro 6). Finalmente, los valores de intercepto (b: 4.4702138) y pendiente (m: -1.3806108) se utilizaron para construir el modelo lineal y así obtener los pesos moleculares de las diferentes bandas mostradas en los biotipos de *B. tabaci* (ver Figura 13).

Figura 12. Migración y determinación de los pesos moleculares de las bandas de los diferentes polimorfismos de *B. tabaci* por medio de la técnica de SSCP's

Pb Escalera	Migración electroforética de las bandas (mm)										Pb estimados	
	Escalera	Patrones		Biotipos nativos								
		B	A	G1	G2	G3	G4.1	G4.2	G5	G6		
23130	1											
		1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	27438
		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	25497
		16										13501
		17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	12546
		19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	11659
				21				21	21			10572
				28.5	28.5	28.5	28.5	28.5	28.5	28.5	28.5	7326
		29.5										6976
			31	31	31	31	31	31	31	31	31	6483
	31.5										6326	
		32.5	32.5	32.5	32.5	32.5	32.5	32.5	32.5	32.5	6024	
9416	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	5879	
		33.5									5737	
			34	34	34	34	34	34	34	34	5598	
6557	35			35							5331	
				36							5077	
		36.5									4954	
4361	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	4834	
			37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	4717	
				39							4384	
		40		40		40			40	40	4175	
									42		3786	
		43									3605	
		45		45		45					3269	
			46.5						46		3113	
2322	47										3038	
	48							48			2964	
		48.5									2823	
								50.5			2755	
2027	51										2498	

Observe que se coloca, de izquierda a derecha, el peso molecular (pares de bases) conocido de cada banda de la escalera 0.12 – 23.1 kb marca Roche en la primera columna; en la segunda columna se coloca, en milímetros, la migración de las diferentes bandas del mismo marcador; en la tercera y cuarta columna se colocan los polimorfismos de los biotipos A y B como patrones de comparación, y en las siguientes, los patrones de bandas de los siete biotipos criollos detectados para el presente estudio. La última columna presenta los pesos moleculares (pares de bases) estimados para cada banda presentada de los diferentes biotipos de *B. tabaci*. Los números que están dentro de las barras indican la distancia en milímetros a la cual migró la banda a partir del pozo del gel de poli-acrilamida. Entre más oscura la banda, mayor probabilidad de ser teñida por tinción de plata.

Figura 13. Modelo lineal para el cálculo de los pesos moleculares de las pruebas de SSCP's en biotipos de *B. tabaci*.



Cuadro 6. Resultados generales del estadístico de regresión lineal para el cálculo de los pesos moleculares de las bandas expresadas por los polimorfismos de *B. tabaci*

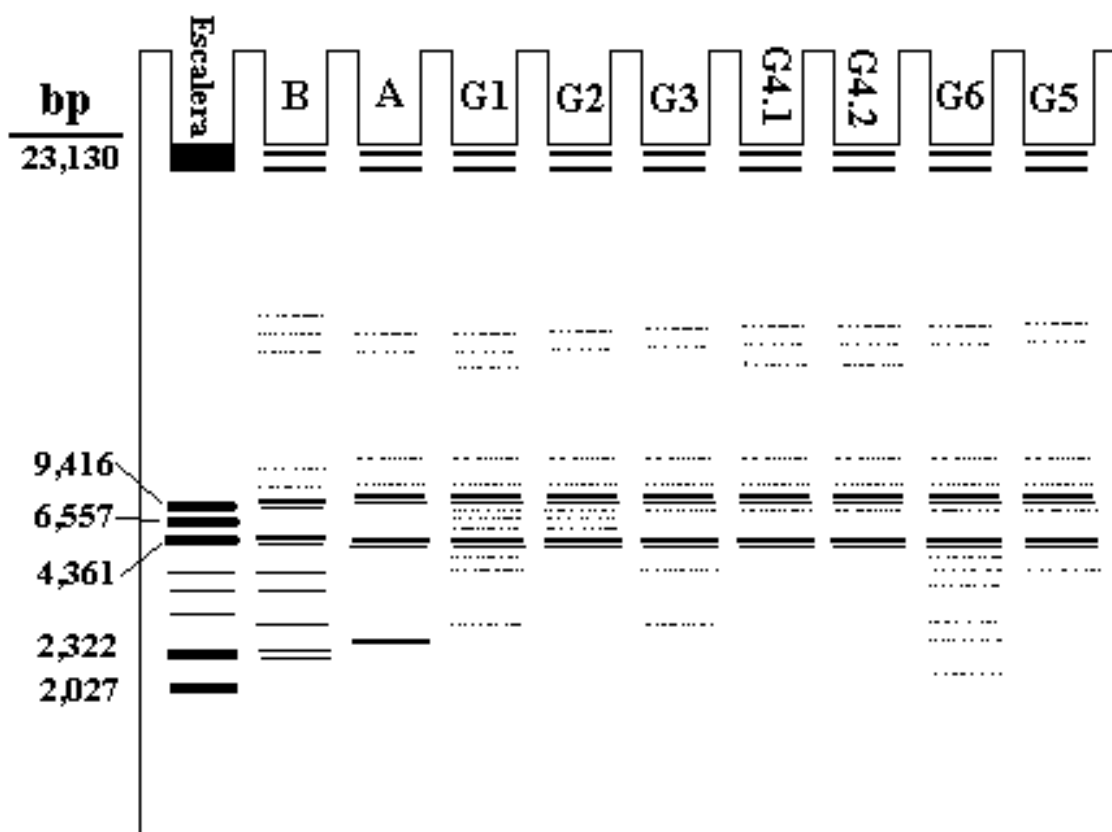
Estadístico	Valor
R múltiple	0.952711708
R cuadrada	0.907659599
R cuadrada ajustada	0.884574498
Error estándar	0.134850971
Observaciones	6
F	39.3179837
Significancia F	0.0033014
Intercepto (b)	4.47021388
Pendiente (m)	-1.3806108

Las 6 observaciones representan a cada una de las bandas observadas para la escalera Kb marca Roche utilizada durante la migración electroforética.

En la Figura 14 se muestran, de una forma más simplificada, los diferentes patrones o polimorfismos encontrados para Guatemala. Observe que las bandas que mayormente se tiñen están señaladas por el marcador en 9,416 y 4,361 pb. Esta migración electroforética es característica del biotipo A y todos los G (ambos del nuevo mundo). Observe que el biotipo B presenta un distanciamiento más cercano entre ambas bandas, lo cual podría ser utilizado para distinguir entre secuencias del viejo y del nuevo mundo. Sin embargo, el biotipo B también posee cinco bandas entre los 4,361 y 2,027 pb, las cuales son más eficaces de utilizar para discriminarle. El biotipo A, también se distingue de cualquier nativo, por la banda característica superior a los 2,322 pb. El resto de biotipos nativos contienen bandas que pueden o no teñirse (bandas punteadas en la Figura 14), lo cual presenta un problema a la hora de la definición real del polimorfismo y por ende el nombre del biotipo.

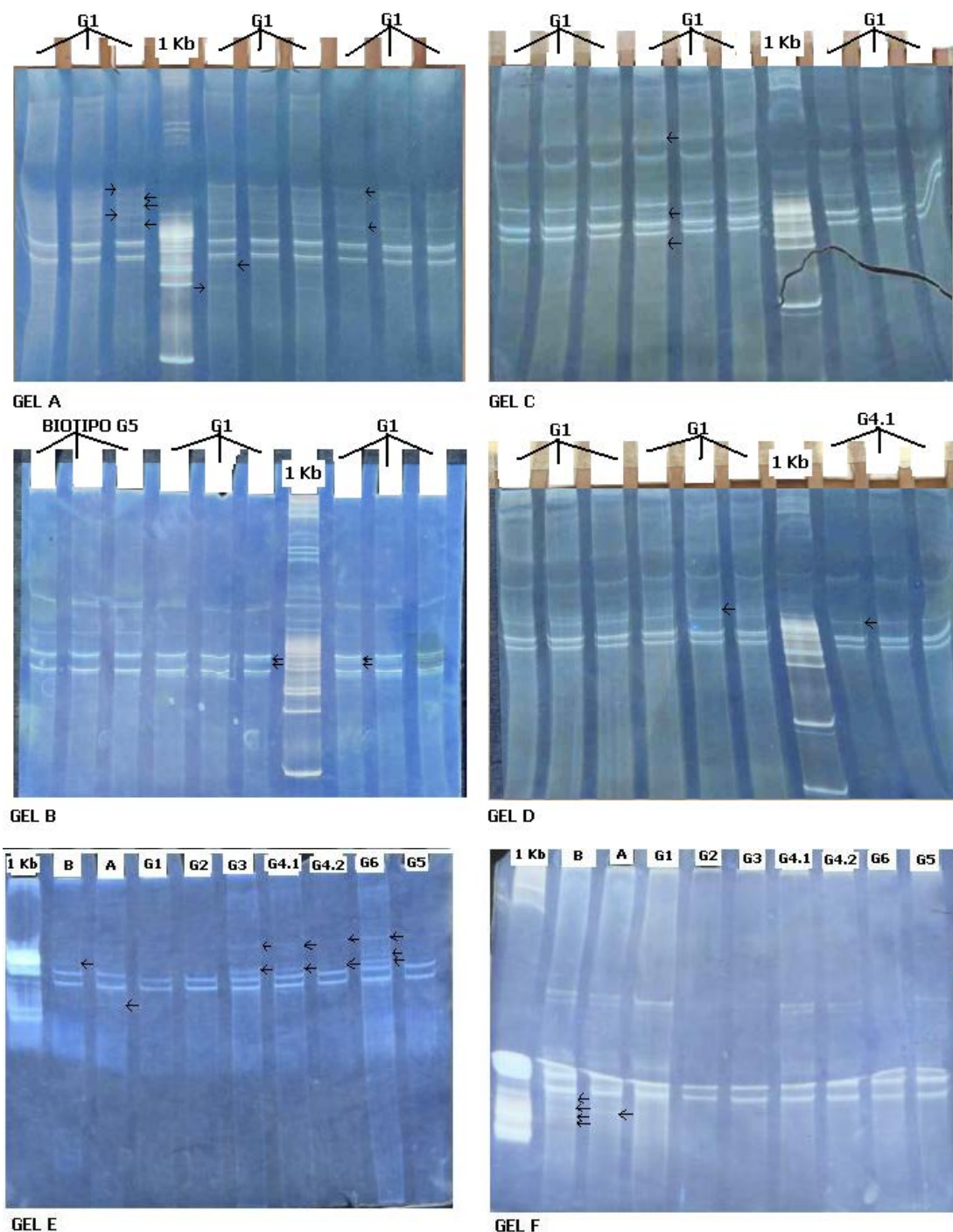
En la Figura 15 se ejemplifica la variación de los patrones obtenidos de los biotipos nativos, siendo el G1 el que presentó la mayor. En la Figura 15.A se observa variación entre las tres réplicas de los tres individuos G1 analizados para este gel. El primero y el segundo presentan cinco bandas superiores a las generales del nuevo mundo, mientras que el tercero solamente se observan dos. El segundo individuo presentó dos bandas inferiores que no se observaron en los otras réplicas de los otros dos individuos. El biotipo G1 también suele presentar dos a tres bandas muy difíciles de diferenciar entre las bandas generales del nuevo mundo, sin embargo, en esta situación, fue muy útil para diferenciarle del biotipo G5 (Figura 15.B). De igual forma, en las Figura 15.C y D existen nuevas variaciones que difieren de las descritas anteriormente.

Figura 14: Esquematación general de los diferentes polimorfismos obtenidos de los biotipos de *B. tabaco* en Guatemala por medio de la técnica de SSCP's para el gen COI.



Entre mayor grosor contenga la banda esquematizada, significa que su probabilidad de aparecer teñida en el gel es mayor que las que son más delgadas. Biotipos A y B se utilizaron como controles comparativos. Ambos obtenidos de colonias reproducidas en la Universidad de Arizona (AU), EUA. Los biotipos G4 no presentaron diferencias en el número e interpretación de sus bandas en el presente protocolo; sin embargo, se presentan en la figura anterior dado a que son diferentes en su secuencia de ADN.

Figura 15: Demostración de la irregularidad de los patrones obtenidos en diferentes biotipos de *B. tabaci* establecidos mediante la técnica de SSCP's.



En cada muestra se señala con flechas cada banda característica que presentó variación en el patrón establecido. Gel A: de izquierda a derecha se presenta el primer triplicado del biotipo G1 provenientes de Petén Santa Elena, el siguiente de Guatemala Amatitlán y el último de Retalhuleu Caballo Blando. Gel B: primer triplicado biotipo G5 en Chiquimila Ipala, biotipo G1 en segundo triplicado proveniente de Chiquimula Esquipulas y tercero de Petén Santa Elena. Gel C: primer triplicado de El Progreso Sanarate, segundo de Zacapa y el tercero de Santa Rosa. Gel D: biotipo G1 primer triplicado de Guatemala Amatitlán y segundo de Baja Verapaz Salamá, tercer triplicado de biotipo G4.1 de Guatemala. Geles E y F, se realizaron para comparar todos los polimorfismos de los biotipos criollos de Guatemala con las secuencias A y B.

D. Análisis de datos

1. Asociación entre biotipo, altura y región. En la Figura 16 se observa que el biotipo G1 es el mayormente distribuido en las cuatro regiones en que se colectó *B. tabaci*. A pesar de que su abundancia es mayor al 80% en el oriente y centro, las otras regiones son dominadas por otros biotipos: el G2 en el norte con 81.25% y el G3 en el sur con 72.22%. Estos últimos dos también se detectaron en otras regiones pero con muy baja frecuencia. El biotipo G5 se encontró restringido únicamente al oriente, además de presentar baja frecuencia (13.71%). Los denominados G4 y G6 también se detectaron con muy baja frecuencia pero se observó que estaban restringidos al centro y sur respectivamente. La obtención de un valor $X^2= 209.1$ mayor al valor crítico con 24 grados de libertad (36.4) permitió rechazar la hipótesis nula, comprobando la asociación entre las variables biotipo y región ($P < 0.05$).

En la Figura 17 se observa que todos los biotipos se detectaron en alturas menores a los 2000 m SNM. El biotipo G1 presentó la distribución más amplia, ya que se encuentra en todos los intervalos de altura, preferiblemente entre 500 – 2000 m SNM. El biotipo G3 también es muy amplio en los rangos de altura, detectado desde los 0 – 500 y 1000 – 2000 m SNM. En los biotipos G2 y G5 se observó mayor restricción, pero parecían tener preferencia de 100 – 250 y 500 – 1000 m SNM respectivamente, aunque también se detectaron con menor frecuencia en otros intervalos. Solamente G4.1 y G4.2 fueron detectados en un 100% entre 1000 – 2000 m SNM, al igual que G6 de 0 – 100 m SNM. Las estadísticas determinaron un $X^2= 112.4$ mayor al valor crítico con 30 grados de libertad (43.8), permitiendo rechazar la hipótesis nula y concluir que existe asociación entre la variable biotipo e intervalo de altura ($P < 0.05$). En la Figura 18 se observa la distribución geográfica de los diferentes biotipos registrados para el presente estudio.

Figura 16: Porcentaje de biotipos de *B. tabaci* detectados en las diferentes regiones de Guatemala durante 2006-2008

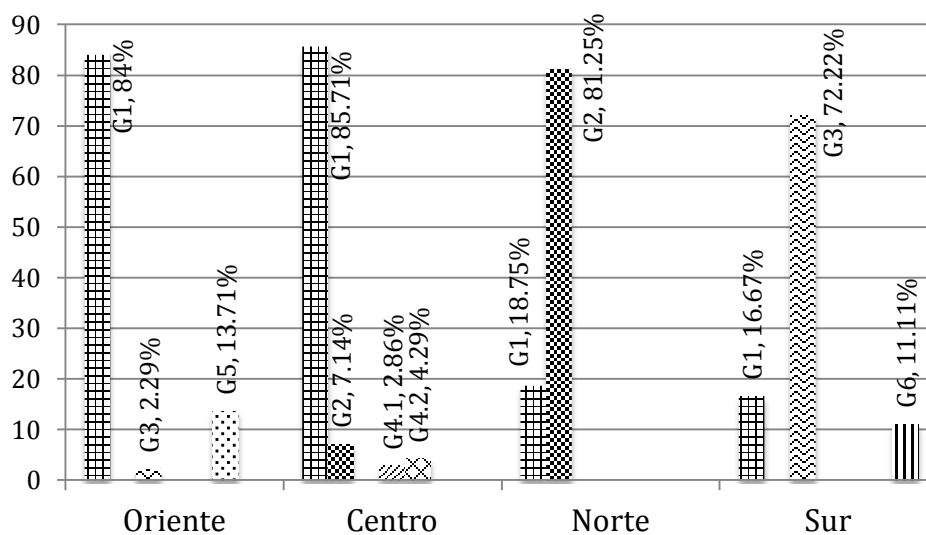


Figura 17: Porcentaje de biotipos de *B. tabaci* según intervalos de altura de Guatemala 2006 – 2008.

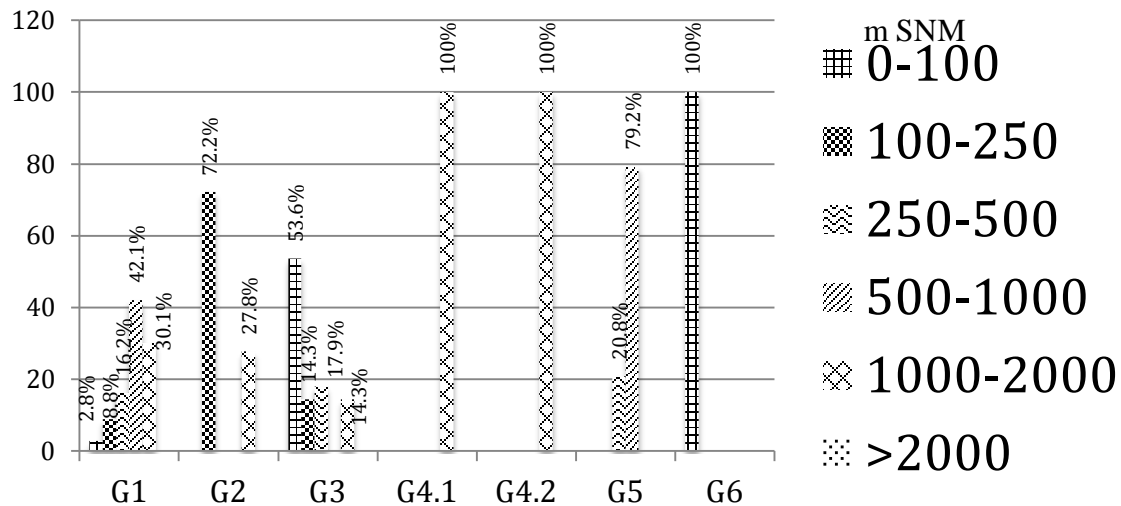
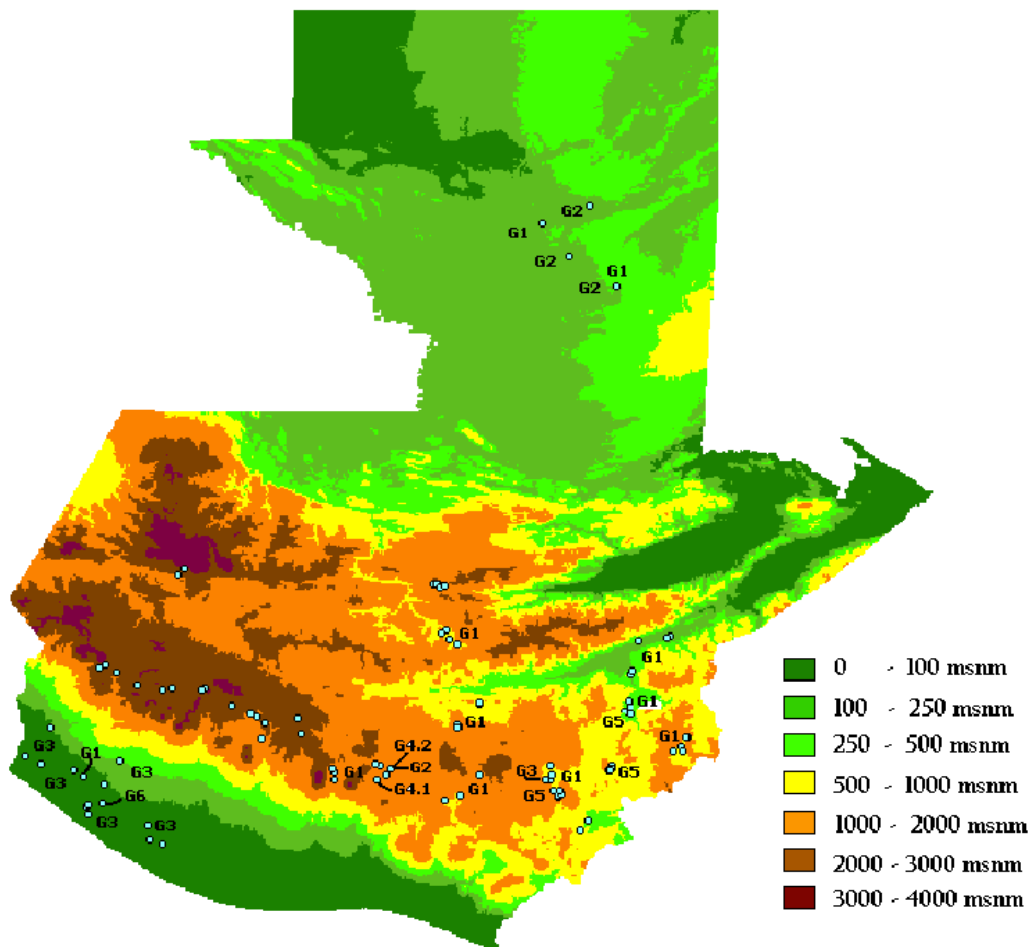


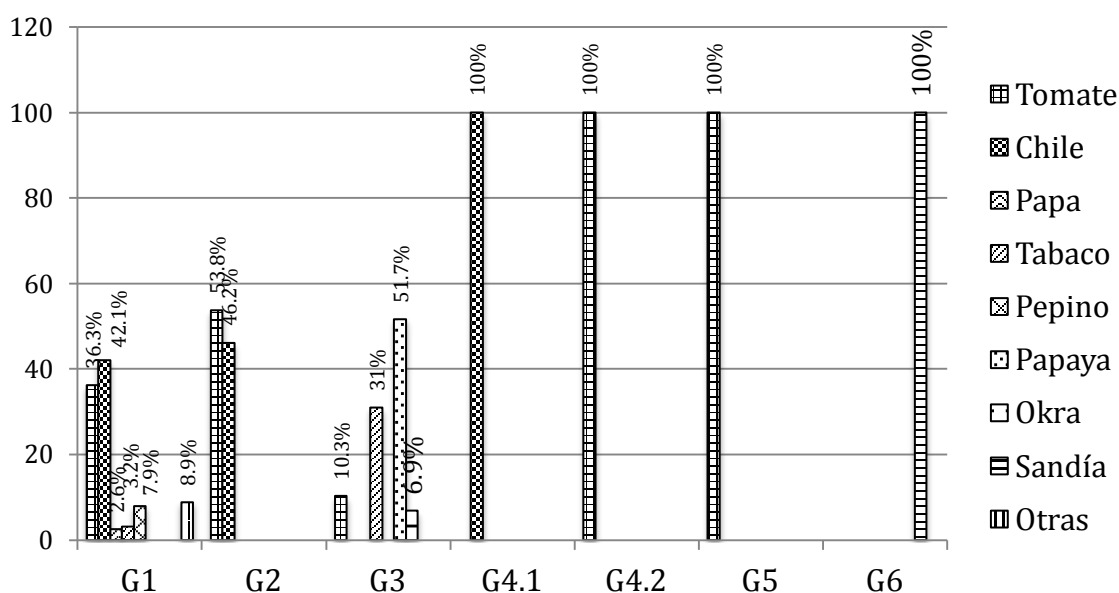
Figura 18: Distribución geográfica de los biotipos de *B. tabaci* en Guatemala, 2006 - 2008



Se presentan los diferentes intervalos de altura utilizando diferentes colores.

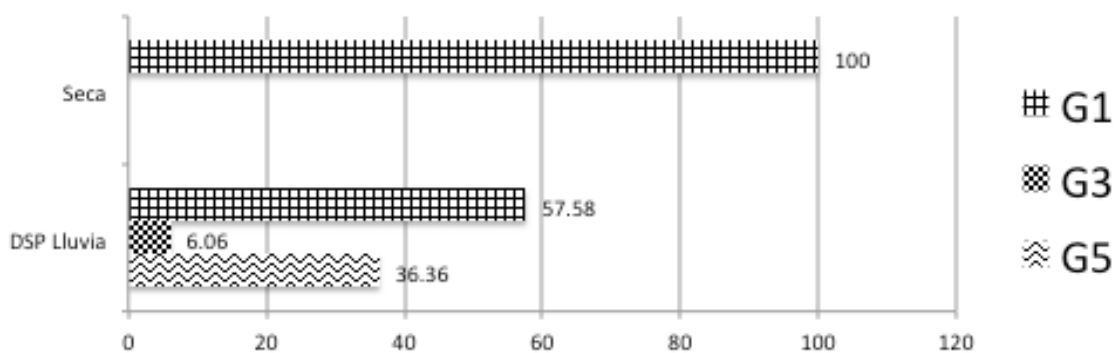
2. Asociación entre biotipo y tipo de cultivo. En la Figura 19 se observa un orden decreciente de los biotipos $G1 > G3 > G2 > G4.1 = G4.2 = G5 = G6$ conforme al número de hospedantes o cultivos en los cuales se les colectó. Los biotipos polífagos G1 y G2 presentaron mayor preferencia por cultivos de tomate y chile, mientras que el G3 en papaya (51.7%) y tabaco (31.0%). El resto se detectó en un 100% para un solo tipo de cultivo: el G4.2 y G5 en tomate, G4.1 en chile y G6 en sandía. Observe que solamente los biotipos G3 y G6 no presentaron preferencia por solanáceas. Las pruebas estadísticas demostraron un $X^2=156.5$ mayor al valor crítico con 48 grados de libertad (65.2), lo cual permitió rechazar la hipótesis nula y determinar que existe un grado de asociación entre la variable biotipo y tipo de cultivo ($P < 0.05$).

Figura 19: Porcentaje de biotipos de *B. tabaci* por tipo de cultivo en Guatemala 2006 – 2008

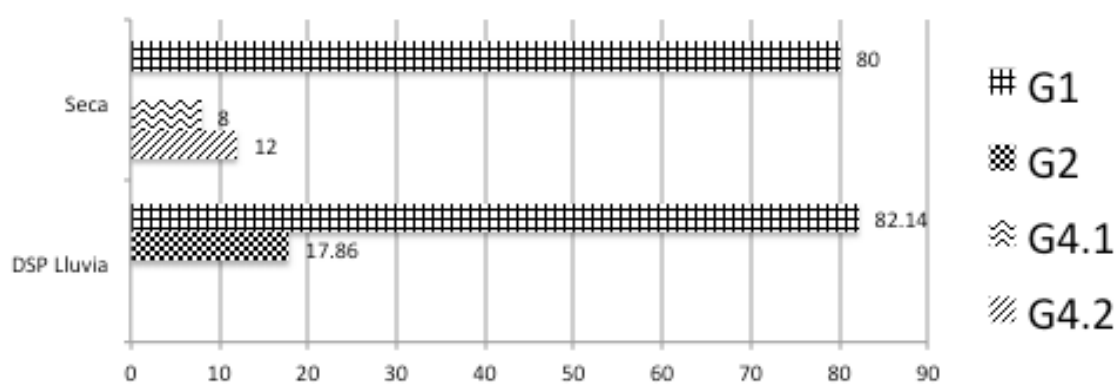


3. Asociación entre biotipo y temporada de colecta. Según la Figura 20, se observa una distribución diferenciada de los biotipos conforme a las temporadas de colecta seca y después de la lluvia (DSP lluvia) para el oriente y centro de Guatemala. De todos los biotipos detectados, el G1 presentó dominancia en ambas temporadas y regiones. En el oriente experimentó una reducción del 100% en la temporada seca a un 57.58% después de la lluvia, ya que aparecen con menor frecuencia G3 y G5 con 6.06% y 36.36% respectivamente. En el centro se detectaron G4.1 y G4.2 con 8.0% y 12.0% respectivamente durante la temporada seca, y el G2 con 17.86% después de la lluvia, sin afectar drásticamente la abundancia de G1. Finalmente, se obtuvo un valor $X^2= 28.3$ mayor al valor crítico con cinco grados de libertad (11.1) lo cual permitió rechazar la hipótesis nula y aceptar la asociación entre las variable biotipo y temporada por región ($P < 0.05$).

Figura 20: Porcentaje de biotipos por temporada y región de Guatemala 2006 – 2007.



(A) Porcentaje en oriente



(B) Porcentaje en centro

No fue posible agregar los datos de colecta del año 2008, ya que sólo se contaba con la colecta de la temporada seca. De igual forma, sólo se tomaron en cuenta oriente y centro, ya que las otras tres regiones no formaron parte del plan de colecta para el monitoreo de 2006 y 2007.

IV. DISCUSIÓN

A. Método de selección de muestras

Los biotipos de *B. tabaci* presentan características ecológicas diferentes con respecto a su preferencia por hospederos, temperatura, altura, etc. Por lo tanto, se utilizó un tipo de muestreo intencional o de opinión, en donde el tamaño de la muestra fuera elegida en base a la selección de los factores que facilitarían la detección de todos los biotipos presentes en Guatemala (Barreiro y Albandoz 2001). Para seleccionar los factores, se estratificaron las muestras por cada año de colecta. Cada estrato representó un factor por el cual se creía podrían existir diferencias en biotipos (tipo de cultivo, temporada, altura, región), y en cada una se eligió una sub muestra. En este estudio se cree más importante la opinión de una persona hacia la elección de una muestra representativa (Barreiro y Albandoz 2001). Un muestreo totalmente aleatorio podría perder la validez por no tomar en cuenta algunos de los factores que diferenciarían a los biotipos.

La obtención de las muestras también presentaron limitaciones a la hora de su selección. Los cultivos cambian de una región a otra, por lo que la elección de similares se dificultó para comparar en las diferentes regiones en que se encontró *B. tabaci*. En especial en el 2006 y 2007, la mayoría de cultivos estaban determinados por solanáceas (tomate y chile) lo cual dificultó la comparación con el 2008 en donde se colectó de diferentes familias. Finalmente, como las colectas de 2006 y 2007 ya habían sido realizadas, muchos de los individuos de *B. tabaci* fueron utilizados en proyectos anteriores. Sin embargo, se utilizaron las que aún permanecían almacenadas y en buen estado.

Se trataron 390 muestras de mosca blanca de forma individual, de las cuales se lograron amplificar 297 para el gen CO1: 104 muestras del 2006, 92 del 2007 y 101 del 2008. El aumento de 90 moscas más sobre el total de 300 especificado en la metodología, se debe a que no todos los individuos presentaron la banda de amplificación. Esta falta de amplificación puede ser resultado de una falta de extracción de ácidos nucleicos por una mala maceración o por mal almacenamiento. Varias muestras, en especial las moscas obtenidas de cultivos meloneros del 2006 y 2007 presentaron ausencia o bandas inespecíficas.

B. Filogenia de *B. tabaci* para Guatemala

Cualquier tipo de gen puede ser utilizado para demostrar la filogenia de un organismo, pero existen ciertos genes cuyo trayecto hereditario ha sido descrito por ciertos científicos como mejores espejos de la realidad evolutiva de una especie. Los genes mitocondriales han sido recomendados especialmente por su alta capacidad de conservación. Sin embargo, el gen mitocondrial COI ha demostrado mayor conservación e información evolutiva que otros mitocondriales como el 16S, e inclusive algunos nucleares. En 1999 se logró demostrar por primera vez que el biotipo B era originario del viejo mundo, al igual que construir la primera filogenia de *B. tabaci* que colocaba los biotipos del viejo y del nuevo mundo en clados separados (Frohlich *et al.* 1999). Por ello mismo, se decidió la construcción de la filogenia de los biotipos de Guatemala en base al gen COI.

El análisis filogenético realizado durante el monitoreo de 1999 fue criticado de no visualizar con detalle el distanciamiento entre las diferentes secuencias de Guatemala (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999, ver Figura 4). Sin embargo, en el análisis actual se encontró que también era representativo de la baja variación del gen COI. Su distanciamiento real debe ser corto como el observado en el monitorio de 1999, ya que su valor porcentual de similitud es mayor al 98% entre todos los biotipos nativos registrados en el presente estudio (ver Cuadro 5). Esta baja variación en las secuencias del gen COI para *B. tabaci*, y la detección de biotipos característicos de una región en otras, indica la posibilidad de intercambio genético entre los mismos. Actividades como el transporte de plántulas, rastrojo o cualquier otro material infectado, son los principales factores que permiten que se amplíe su ámbito geográfico y tengan la oportunidad de tener contacto (ver Figura 18). Sin embargo, existen sitios puntuales en el gen en donde es muy común encontrar una sustitución o delección de un nucleótido (Cuadro 4). Esta última observación, permite concluir que a pesar de que mantienen un área simpátrica¹, existe la posibilidad de aislamiento genético. Las secuencias para los biotipos G6, G5, G4.1 y G4.2 son ejemplos de biotipos que se detectaron únicamente en una región del país.

Otra observación que se realizó es con base a la posición de la raza sida de Puerto Rico en el estudio de 1998 y 1999, ya que éste ocupa una posición intermedia entre las secuencias de Guatemala, lo cual sugiere una alta similitud entre las secuencias de una raza que se encuentra únicamente en Puerto Rico con las que están en Guatemala (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999, ver Figura 4). En el estudio actual, la raza sida ocupa un lugar fuera del cladograma de las razas criollas de Guatemala (Figura 11), lo cual permite explicar un mayor distanciamiento genético entre sus secuencias, y por lo tanto, mayor tendencia a la

¹ Nombre que se le da al área de traslape entre la distribución geográfica de dos o más organismos diferentes.

monofilia² para los biotipos criollos del país. Únicamente se observa una secuencia proveniente de Honduras, la cual presenta alta similitud con las secuencias de los biotipos criollos de Guatemala; sin embargo, Honduras es un país frontera con Guatemala, lo cual puede propiciar el fácil transporte de estos biotipos criollos entre los dos países.

C. Protocolo SSCP's del gen COI para *B. tabaci*

El comportamiento de la desnaturalización³ y renaturalización⁴ del gen COI es la primera característica más notable a la hora de teñir los geles de poliacrilamida en la elaboración de este protocolo. Los cebadores de COI amplifican una región de aproximadamente 1000 pb dentro del gen mitocondrial, pero al migrarlo en geles de poliacrilamida al 10%, las secuencias desnaturalizadas se hibridizan unas con otras formando moléculas mucho más pesadas. Las migraciones electroforéticas de las diferentes bandas y los pesos determinados en la Figura 12 demuestran lo anteriormente descrito.

Las mayores limitaciones sobre la técnica están dadas por la falta de claridad e interpretación de las bandas que servirían para distinguir entre los diferentes biotipos criollos. El comportamiento de desnaturalización – renaturalización parece no seguir un patrón establecido de hibridización, lo cual explicaría el por qué muchas bandas puedan o no aparecer. Sin embargo, también puede deberse a la cantidad de ADN que se logró amplificar. Siendo este el caso, muchas de las bandas tendrían mayor oportunidad de renaturalizarse y aparecer en las diferentes migraciones observadas. Otra explicación, y posiblemente la más certera, puede deberse también al bajo polimorfismo comprobado por el método de secuenciación. Esto explicaría que la formación de varias bandas en los geles dependerían de nueve pares de bases diferentes a la secuencia consenso.

A pesar de las limitaciones anteriores, el protocolo puede utilizarse para discriminar entre los biotipos A, B y G, pero su dificultad de discriminación aumenta al tratar de definir los diferentes biotipos criollos de Guatemala (ver Figura 14). Sin el uso adecuado de las herramientas de secuenciación, no se recomienda utilizar este protocolo para discriminar entre los biotipos criollos de Guatemala. Sin embargo, podría utilizarse como herramienta base para la discriminación de biotipos no nativos de Guatemala, incluso, si en un futuro se lograra detectar el biotipo Q de mosca blanca.

² Término sistemático utilizado para indicar que todos los individuos provienen de un mismo ancestro.

³ Cambio estructural de la conformación original de la doble hebra de ADN; la molécula se separa en dos fragmentos (simple hebra).

⁴ Momento en el cual la molécula de ADN adopta su conformación original (doble hebra) a partir de un estado desnaturalizado.

D. Factores asociados a la distribución de biotipos de *B. tabaci*

Los factores propuestos para la selección de la muestra no tendrían validez sin la comprobación de asociación con los diferentes biotipos encontrados en Guatemala. La construcción de cuadros de contingencia y su respectivo valor estadístico Chi^2 nos pueden promover esta función, y de forma eficiente, comprobaron que existía al rechazar la hipótesis nula. Sin embargo, solamente conocemos que existe dependencia entre las variables, pero no podemos decir cuál es la asociación. Para ello se requeriría realizar una correlación. El conocimiento de la dependencia solamente nos permite sugerir que los biotipos de Guatemala podrían ser dependientes por la diversidad de cultivos, niveles de altura y condiciones climatológicas que presenta Guatemala en su relieve.

1. Biotipos criollos

a. Región y altura. Los resultados demuestran que los biotipos de Guatemala presentan asociación a una región en específico, que al mismo tiempo está compartida con el nivel de altura (ver Figura 16 y Figura 17). Esto es, ya que muchos intervalos de altura son característicos de la topografía de las regiones del país. La mayoría de los biotipos de *B. tabaci* necesitan una temperatura de 30 – 33° C para cumplir satisfactoriamente con el desarrollo de sus larvas (Cabello *et al.* 1996), lo cual explica su distribución en ambientes tropicales con alturas menores a los 2000 m SNM. Es por esto que su abundancia aumenta en el oriente y costa sur de Guatemala, debido a que son regiones de bajas altitudes y altas temperaturas. El aumento considerable de *T. vaporariorum* en el occidente se debe a que está adaptada a un clima más frío, ya que su abundancia es menor al disminuir altitud. En el caso de los biotipos nativos, podríamos concluir que G1 está mucho más adaptado a cualquier cambio ambiental o por altitud, al igual que el G3 en menor grado. El resto de biotipos podrían indicar adaptaciones más especializadas a un solo tipo de región, por lo que es muy difícil encontrarlos en otra diferente (ver Figura 18).

b. Tipo de cultivo. La asociación encontrada entre el tipo de cultivo y el biotipo se encuentra delimitada por el área geográfica en la cual crece ese tipo de cultivo. Esto es por ejemplo, cultivos de papa sólo crecen en regiones altas como el occidente, o papaya en regiones bajas como la costa sur. Los biotipos de *B. tabaci* se adaptan o especializan en estos cultivos para obtener sus nutrientes, pero la facilidad de transporte de las mismas hacia otras regiones les obliga muchas veces a cambiar de hospedero (Brown y Bird 1995, ver Figura 19). Los biotipos G1 y G3 son ejemplares claros que infestan varios tipos de cultivo (polífagos), ya que se encuentran a lo largo de diferentes regiones en donde los cultivos no son siempre los mismos. Sin embargo, también pueden haber cultivos, como el tomate y el chile, que se siembran en varias de las regiones del país. Esto permite que un biotipo pueda infestar el mismo cultivo en diferentes regiones, como es el caso del G2 detectado en el norte y centro infectando los mismos. El resto de biotipos podría

indicar que están especializados solamente a un tipo de cultivo, pero no se puede concluir con certeza ya que los dos biotipos G4 y G6 solamente se detectaron una vez durante todo el monitoreo. Sólo el biotipo G5 se encontró en un tipo de cultivo de forma repetitiva, por lo que podemos concluir con certeza que es característico de plantaciones de tomate en la región oriente.

c. Temporada. Se observa dependencia del tipo de biotipo conforme a la temporada, ya que los biotipos G5, G3, G4.2, G4.1 y G2 aparecen únicamente en una temporada (no importando la región), y el biotipo G1 es el único que aparece en ambas temporadas (de ambas regiones), por lo tanto, éste es el único biotipo que no presentó dependencia.

Esta dependencia puede ser resultado al cambio medio ambiental que ocurre de una temporada a la otra, permitiendo el mayor desarrollo de algunos biotipos en cierta temporada, e indicando su sensibilidad al cambio medio ambiental en la siguiente. Algunos biotipos, como G3 y G5 en la región oriental, se puede sugerir que presentan cierto tipo de sensibilidad al aumento de temperatura durante la época seca, y por lo tanto las poblaciones de G1 aumentan considerablemente durante esta estación. Las lluvias parecen ser un factor importante para disminuir las poblaciones de G1 en la región oriental, lo cual permite el aumento de las poblaciones de los biotipos G3 y G5 cuando han cesado las lluvias (ver Figura 20.A). En el caso de la región Central, el biotipo G1 también presentó la mayor dominancia en ambas temporadas; sin embargo, otros biotipos también estuvieron presentes en ambas temporadas. Los resultados sugieren que los biotipos G4.1 y G4.3 prefieren temperaturas altas durante la temporada seca; sin embargo, son susceptibles a la lluvia, por lo que sus poblaciones son reemplazadas por poblaciones de biotipo G3 en la temporada después de las lluvias (ver Figura 20.B).

La discusión anterior es una sugerencia a la posible dinámica que presentan las poblaciones de los diferentes biotipos de *B. tabaci* en Guatemala. Sin embargo, se necesita una mayor cantidad de datos, especialmente de los biotipos que fueron detectados con muy baja abundancia (como por ejemplo G4.1 y G4.2), y también de los otros departamentos que conforman las otras regiones no discutidas en este estudio (norte y sur), para poder concluir acerca de las dinámica de estas poblaciones.

2. Biotipos introducidos. El biotipo B de *B. tabaci* fue reportado únicamente para cultivos de melón en la región oriente de Guatemala durante el año 1995 (Krafka 1995), y en el monitoreo de 1999 éste representaba más del 70% de las detecciones en el mismo cultivo (Orozco 1999; Palmieri *et al.* 1999). En el presente estudio no se logró detectar el biotipo B, debido a la falta de moscas colectadas sobre este tipo de cultivos; sin embargo, su ausencia sugiere que el mismo aún no se ha adaptado a otros tipos de plantaciones diferentes al melón en Guatemala.

En el caso del biotipo Q la situación es más alarmante, ya que se ha observado mayor resistencia a una alta cantidad de insecticidas que se utilizan en Guatemala (Stansly, *et al.* 2005). El primer registro de biotipo Q para Guatemala se obtuvo a partir de colectas de mosca blanca en invernaderos comerciales de pascuas en marzo de 2005; sin embargo, no se logró detectar en plantas silvestres y otras plantaciones cercanas a estos invernaderos. Tres años después, en el presente estudio, los resultados indican la detección negativa del biotipo Q en regiones del país cercanas al área de la primera detección. Estos resultados sugieren que el biotipo Q aún no logra, o no ha logrado, adaptarse a otros tipos de cultivos y otras regiones de Guatemala. Para corroborar su dispersión en zonas cercanas a los invernaderos afectados, se colectaron muestras de mosca blanca en plantas silvestres y otros cultivo; sin embargo, los resultados demostraron una alta abundancia de la especie *T. vaporariorum* (100% de colecta). La especie *B. tabaci* no fue colectada en el departamento de Sacatepéquez o Altiplano de la región occidental del país.

Es evidente que el efecto de adaptación y dispersión del biotipo Q pueda estar influenciado por los factores ambientales en el cual se observó inicialmente en Guatemala. La especie *B. tabaci* presenta tanto un mejor desarrollo como efecto virulento en altas temperaturas de zonas bajas (30 a 33° C aproximadamente, Cabello *et al.* 1996), por lo que el biotipo Q, siendo de origen Mediterráneo, posiblemente encontraría mayor facilidad de dispersión y adaptación en ambientes cálidos. Zonas con mayor altitud presentan un descenso en la temperatura ambiental, provocando un cambio en las especies de mosca blanca que soportan este cambio ambiental (como por ejemplo la mayor abundancia observada de *T. vaporariorum* en el altiplano y occidente de Guatemala). El biotipo Q se detectó en al menos 7 estados de Estados Unidos, todos ellos con altitudes bajas a medias que posiblemente han facilitado su dispersión (entre ellos Arizona y California, Shatters *et al.* 2009); sin embargo, en Guatemala también existen regiones cálidas con altitud media y baja en las cuales aún no ha sido comprobada su dispersión.

E. Comparaciones con otros monitoreos de mosca blanca

El monitoreo de 1999 también evaluó la dependencia de las mismas variables utilizadas en el presente estudio (altura, región, cultivo y temporada), únicamente que utilizó la técnica de esterasas no específicas con la que se detectó siete patrones diferentes de biotipos de *B. tabaci*. Aunque las técnicas no podrían ser comparadas si partimos de la migración electroforética, se determinó cierta similitud entre algunos biotipos de ambos estudios, por los resultados que muestran dependencia en algunas de estas variables. El biotipo G1 del presente estudio demuestra similitud con el G5 presentado en el monitoreo de 1999 por varias observaciones: 1) Ambos presentan dominancia en abundancia en el oriente (G1 con 84% y G5 con 76%) y disminuyen considerablemente en la región sur (G1 con 16.67% y G5 con 24%) (ver Figura 16 para G1 y Cuadro 2 para G5). 2) Presentan detección similar en el mismo rango de altura, G1 se reportó con mayor abundancia de 500 a 2000 m SNM mientras G5 de 401 a 1800 m SNM (ver Figura 17 para G1 y Cuadro 3

para G5). 3) Presentan dominancia en la temporada después de las lluvias en el oriente, G1 con el 100% y G5 con el 90% (ver Figura 20.A para G1 y Cuadro 3 para G5). La otra temporada no se comparó ya que se muestreó en temporadas diferentes (seca para el estudio 2006 – 2007 y antes de las lluvias para el estudio 1998 – 1999) y tampoco puede ser comparada con la región sur, ya que las muestras del 2006 y 2007 sólo fueron realizadas en el oriente y centro. 4) Ambos son polífagos y tienen preferencia en cultivos de solanáceas como chile y tomate (ver Figura 19 para G1 y Cuadro 2 para G5).

De la misma forma, los resultados sugieren que el biotipo G3 del presente estudio adquiere similitud con el G6 del monitoreo de 1999 por: 1) Ambos presentan dominancia en abundancia en la región sur, en donde G3 reportó 72.22% de detección y G6 el 75% (ver Figura 16 para G3 y Cuadro 2 para G6). 2) Presentan un intervalo de altura de detección similar, en donde G3 se detectó principalmente de 0 a 500 m SNM y G6 de 201 a 400 m SNM (ver Figura 17 para G3 y Cuadro 3 para G6). 3) Referente a cultivos, el G3 prefiere papaya, el cual es un cultivo que no se muestreó durante la detección del G6 en el monitoreo de 1998 y 1999; sin embargo, ambos se detectaron con abundancias significativas en las plantaciones de tomate y tabaco (ver Figura 19 para G3 y Cuadro 2 para G6). 4) Finalmente, al igual que los anteriores biotipos, sólo puede ser comparada con la temporada después de la lluvia. En ella, ambos aumentan su porcentaje de incidencia o aparecen en la región oriente (Figura 20.A para G3 y Cuadro 3 para G6).

Según lo especificado por el monitoreo de 1998 - 1999, el biotipo B parece ser el biotipo G4, mientras que el A presenta similitud con el G7. Como no se detectó ninguno de los biotipos B o A en el estudio actual (2008), se cree que los biotipos G4 y G7 del monitoreo de 1999 tampoco fueron detectados en el presente estudio. De la misma manera, el biotipo G3 de 1999 no se logró detectar en el presente estudio, probablemente a que fue detectado únicamente en cultivos que no se observaron o que la incidencia de *B. tabaci* fue muy baja durante el presente estudio (cucúrbitas y frijol). Finalmente el biotipo G5 del presente estudio (2008), parece ser un nuevo biotipo no detectado por el monitoreo de 1999 o previos. Es el único en presentar total especialización por el cultivo de tomate en el oriente durante la temporada después de la lluvia. Cuando la temporada cambia es totalmente reemplazada por el biotipo G1.

El resto de biotipos: G4.1, G4.2 y G6, se detectaron sólo una vez en un tipo de cultivo. Ambos G4 se diferencian en tan solo una base, y de dos a tres bases de diferencia entre la secuencia del biotipo G1. El biotipo G6 fue el que presentó mayor variación con respecto a las siete secuencias encontradas; sin embargo, posee sitios de sustituciones compartidas con el G5. Tales observaciones podrían determinar que se trate de organismos que hayan tenido mutaciones puntuales, pero también cabe la posibilidad de que haya error en la síntesis de la ADN polimerasa, o incluso en el proceso de edición y limpieza de secuencias mediante las técnicas de programación utilizadas.

Otra observación, es la asociación dependiente que se encontró entre la presencia de biotipo y las variables de cultivo y temporada en el presente monitoreo. En 1999, este análisis fue totalmente independiente. Este cambio, se puede explicar a que el de muestreo fue realizado casi exclusivamente en plantaciones de solanáceas. Solamente las colectas del año 2008 abarcaron diferentes familias de cultivos, lo cual definitivamente intervino a la hora de calcular el valor estadístico chi^2 y así poder registrar una mayor dependencia en las variables.

V. CONCLUSIONES

1. La filogenia de mosca blanca para Guatemala está representada por siete biotipos criollos: G1, G2, G3, G4.1, G4.2, G5 y G6. Los mismos se agrupan en un clado hermano, paralelo a otros biotipos del continente americano, lo cual sugiere una tendencia monofilética.
2. El protocolo para la detección de biotipos de *B. tabaci* en Guatemala (conformación del polimorfismo de una sola banda del gen COI) permite diferenciar entre los biotipos B, A y G; sin embargo, el bajo polimorfismo registrado para los diferentes biotipos G (criollos de Guatemala) dificulta su discriminación. Estos resultados sugieren que para poder obtener mayor certeza en la identificación del biotipo se deba recurrir a la secuenciación.
3. Los biotipos criollos de *B. tabaci* están distribuidos en cuatro de las cinco regiones de Guatemala: sur, centro, norte y oriente. El Biotipo G1 presentó una distribución más amplia, ya que se observó en las cuatro regiones en donde se registró *B. tabaci*. El biotipo G2 se observó en el centro y en el norte, con una mayor abundancia en la región norte. El biotipo G3 se observó en el sur y en el oriente, con una mayor abundancia en la región sur. Los biotipos G4.1, G4.2, G5 y G6 presentaron una distribución mayormente restringida: los biotipos G4.1 y G4.2 se registraron en la región central, el biotipo G5 en la región oriente y el G6 en el sur.
4. El polimorfismo de los biotipos criollos de *B. tabaci* para Guatemala puede observarse en nueve diferentes regiones dentro de las 780 pb secuenciadas del gen mitocondrial COI. Estas nueve regiones contienen mutaciones, entre ellas: deleciones, sustituciones o inserciones de una sola base y cuyas combinaciones conforman las siete diferentes secuencias de los biotipos criollos. Los biotipos G5 y G6 son los biotipos con mayor cantidad de regiones diferentes a la de la secuencia consenso (G1), los otros biotipos presentan una combinación diferente de estas mutaciones pero en menor cantidad.
5. El análisis de cuadros de contingencia mediante la prueba de χ^2 permitió rechazar las diferentes hipótesis nulas propuestas en el presente estudio. Estos resultados sugieren que el biotipo de *B. tabaci* presenta dependencia a la región, intervalo de altura, tipo de cultivo y temporada.
6. Se realizó una comparación de los biotipos criollos de *B. tabaci* detectados en el estudio de 1999 con el actual. Se observó que el biotipo G1 del estudio actual presenta similitud con el G5 del estudio de 1999. El biotipo G3 del actual presenta similitud con el G6 de 1999. Los biotipos G3, G4 y G7 de 1999 no fueron detectados en el actual. Finalmente, los biotipos G2, G4.1, G4.2, G5 y G6 del presente estudio son nuevos.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar un monitoreo que incluya muestras de mosca blanca de las cinco regiones, en diferentes cultivos, para ambas temporadas de muestreo (después de las lluvias y antes de las lluvias). En el presente estudio únicamente se pudo determinar para las regiones centro y oriente, ya que no se contaba con muestras de ambas temporadas para las otras tres regiones (ya que estas solo se colectaron durante la temporada seca). Los datos también podrían indicar cierta dependencia del biotipo conforme a la temporada, como lo fue registrado para las regiones centro y oriente, y así poder describir con mayor detalle la dinámica de las poblaciones de los biotipos de *B. tabaci*.
2. Colectar mayor cantidad de mosca blanca en las localidades de Amatlán en la región central e Ipala en la región Oriental para detectar los biotipos G4.1, G4.2 y G6 propuestos en el presente estudio. Estos solo fueron detectados una vez, y no existen otros individuos con estas secuencias para corroborar o tener mayor certeza en el polimorfismo. Su detección posterior, podría ayudar a aclarar si estas variaciones son resultados de mutaciones puntuales o un error cometido en el proceso de edición de secuencias.
3. Se recomienda colectar en zonas que presenten intervalos de altura menores a los 1000 m SNM dentro de la región Occidental. Esto podría ser el factor principal por el cual no se colectó la especie *B. tabaci* en esta zona, y probablemente, ya que es una región con características topográficas y climáticas diferentes a la de las otras regiones, se podrían registrar nuevos polimorfismos en algún biotipo que se encuentre adaptado a este tipo de condiciones. Valles representativos como el de Nentón y Chiantla pueden ser zonas de alta incidencia, dado a la gran cantidad de áreas con alturas menores a los 2000 mSNM.
4. Colectar individuos de mosca blanca en varios cultivos de cucurbitáceas, entre ellas principalmente melón, ya que es el principal hospedero del biotipo B que no fue detectado en el presente estudio. Las secuencias de este biotipo, así como otros que recientemente han sido introducidos (biotipo Q), podrían compararse y agregarse al análisis filogeográfico elaborado para las secuencias de biotipos criollos en este estudio.
5. Se recomienda continuar con el Protocolo de SSCP's para la discriminación del biotipo Q, ya que presenta una secuencia muy diferente a la de las nativas, es muy probable que su polimorfismo en los geles de poli(acrilamida sea muy diferente a las de las razas criollas.

VII. LITERATURA CITADA

- Alvarado, Enrique; R. Meneses y T. Perring. 1991. «Virosis y vectores de virus del melón en Guatemala». *Manejo Integrado de Plagas* [Costa Rica]. 22: 36-40.
- De Barro, Paul and F. Driver. 1997. «Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)». *Australian Journal of Entomology*. 36: 149-152.
- Bethke, James; T. Paine and G. Nuessly. 1991. «Comparative biology, morphometrics, and development of two populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton and poinsettia». *Annals of the Entomological Society of America*. 84: 407-411.
- Brown, Judith; H. Costa, and J. Bird. 1991. «Variation in *Bemisia tabaci* populations based on geographic origin, silverleaf symptom induction and esterase banding patterns». *Phytopathology* [United States of America]. 81: 34-38.
- Brown, Judith. 1994. «Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agroecosystems worldwide». *FAO Plant Protection Bulletin* [Italy]. 42 (12): 3-32.
- Brown, Judith and J. Bird. 1995. «Variability within the *Bemisia tabaci* species complex and its relation to new epidemics caused by geminiviruses». *CEIBA* [Honduras]. 36 (1): 73-80
- Brown, Judith. *et al.* 1995. «Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae)». *Biochemical Genetics* [United States of America]. (33): 205-213.
- Bush, Guy. 1994. «*Bemisia tabaci*; Biotpe or species complex?». Memoria II taller latinoamericano y del caribe sobre moscas blancas y geminivirus. Comisión Nacional de Moscas Blancas. Managua, Nicaragua. págs. 25-30.

- Byrne, David and T. Bellows. 1991. «Whitefly biology». *Annual Review of Entomology* [United States of America]. 36: 431-457.
- Cabello, Tomás. *et al.* 1996. «Biología y control de las especies de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Gen.) y *Bemisia tabaci* (West.) (HOM.; ALEYRODIDAE) en cultivos hortícolas en invernaderos». Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, Sevilla. 96 Págs.
- Campbell, Bruce; J. Steffen-Campbell and R. Gill. 1994. «Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae)». *Journal of Applied Entomology* [United Kingdom]. 113: 416-423.
- Cock, M. J. 1986. «*Bemisia tabaci* – A literature survey on the cotton whitefly with an annotated bibliography». CAB International Institute of Biological Control Ascot, United Kingdom. 121 pages.
- Guatemala. 1990. Consejo Nacional de Algodón (CNA). *Informe final del programa de comités regionales de manejo integrado de cultivos en las regiones algodoneras de Guatemala*. 192 págs.
- Costa, Heather and L.M. Russel. 1975. «Failure of *Bemisia tabaci* to breed on cassava plants in Brazil (Homoptera: Aleyrodidae)». *Ciencia E cultura* [Brasil]. 27: 388-390.
- Costa, Heather. and J. Brown. 1991. «Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci* (Genn.) and the association of one population with silverleaf symptom induction». *Entomologia Experimentalis et Applicata* [United Kingdom]. 61: 211-219.
- Costa, Heather. *et al.* 1993. «Association between *Bemisia tabaci* density and reduced growth, yellowing, and stem blanching of lettuce and kai choy». *Plant Disease* [United States of America]. 77 (10): 969-972.
- Dardón, Danllo. 1993. «Las moscas blancas en Guatemala». En *Las moscas blancas en América Central y el Caribe*, de Luko Hilje. Turrialba, Costa Rica. Informe Final CATIE. Págs. 38-41.
- Dubón, R.; V. Salguero y G. Pareja. 1992. «Metodología para muestrear mosca blanca en tomate». Proyecto de MIP-ICTA-CATIE-ARF. Guatemala. Págs. 53-74.

- Federes, A. 2003. «Transmisión de virus vegetales por artópodos y sus implicaciones epidemiológicas». III congreso nacional de entomología aplicada, IX jornadas científicas de la sociedad española de entomología aplicada. Sesión XII: transmisión de virosis. Págs. 155-158.
- Frohlich, Donald. *et al.* 1999. «A phylogeographical análisis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers». *Molecular Ecology* [United Kingdom]. 8 (10): 1683-1691.
- Fuentelsaz, Carmen. 2004. «Cálculo del tamaño de la muestra». *Matronas Profesión*. 5 (18): 5-13.
- Gerling, David and A. Horowitz. 1984. «Yellow traps for evaluation the population levels and dispersal patterns of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae)». *Annals of entomology* [United Kingdom]. 77 (5): 753-759.
- Gerling, David; A.R. Horowitz and J. Baumgaertner. 1986. «Autecology of *Bemisia tabaci*». *Agriculture Ecosystems and Environment* [Netherlands]. 17: 5-19.
- Greathead, A.H. 1986. «Host plants in *Bemisia tabaci* - a literature survey». CAB International Institute of Biological Control, United Kingdom. Pages 17-26.
- Hilje, Luko. 1995. «Aspectos bioecológicos de *Bemisia tabaci* en Mesoamérica». *Manejo Integrado de Plagas* [Costa Rica]. 35: 46-54.
- Hilje, Luko. 2003. «Estatus del manejo de *Bemisia tabaci* en América Latina y el Caribe: ocho preguntas pertinentes». *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* [Costa Rica]. 70: 88-99.
- Lastra, R. y F. Gill. 1980. «Ultrastructural host cell changes associated with tomato yellow mosaic». *Phytopathology* [United States of America]. 71: 524-528
- Leston, A. 1999. «Dinámica de la población de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) y estudio del parasitismo de *Eretmocerus mundus* Mercet en pimiento (*Capsicum annum* L.)». Tesis Universidad de Almería, Almería. 45 págs.

- Markham, Peter *et al.* 1996. «The transmission of geminiviruses by biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius)». In *Bemisia 1995: Taxonomy, biology, damage, control and management* from David Gerlind and R.T. Mayer. Andover, Hants, Intercept. United Kingdom. Pages: 69-75.
- Matys, J.C. *et al.* 1975. «Purificacao e morfologiado virus deo mosaico dourado do tomateiro». *Summa Phytophathologica* [Brasil]. 1: 267-274.
- Nakhla, M. K. *et al.* 2005. «Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Central America and develop-ment of DNA-based detection methods». *Acta Horticulturae* [United Kingdom]. 695: 277–288
- Orozco, Mónica. 1999. «Empleo de marcadores moleculares para identificar geminivirus en *Bemisia tabaci* (Gennadius) y la relación entre sus diferentes biotipos en cultivos del sur y nor-oriente de Guatemala». Tesis Universidad del Valle de Guatemala. 95 págs.
- Palmieri, Margarita *et al.* 1999. «Marcadores moleculares para la identificación y monitoreo de la distribución de geminivirus y biotipos de *Bemisia tabaci* en plantaciones del sur y del Valle del Motagua, en Guatemala». Proyecto final FONACYT, Guatemala. 141 págs.
- Perring, Thomas *et al.* 1993. «Identificación of a whitefly species by genomic and behavioural studios». *Science* [United States of America]. 259: 74-77.
- Perring, Thomas. 1996. «Biological differences of two species of *Bemisia* that contribute to adaptive advantage». In *Bemisia 1995: Taxonomy, biology, damage, control and management* from David Gerlind and R.T. Mayer. Andover, Hants, Intercept. United Kingdom. Pages: 1-16.
- Salguero, Víctor. 1993. «Perspectivas para el manejo del complejo de mosca blanca – virosis». En *Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe* por L. Hilje y O. Arboleda. CATIE Informe técnico No. 205, Turrialba Costa Rica. Págs. 20-26.
- Stanley, John. 1985. «The molecular biology of geminiviruses». *Advances in Virus Research* [United States of America]. 30: 139 – 177.

B. Extracción de ADN de mosca blanca almacenada en etanol

- Seleccionar sólo moscas hembras de *Bemisia tabaci*.
- Secar la mosca sobre papel *parafilm* por al menos tres minutos.
- Cubrir la parte trasera de la tapa de una caja *petri* con dos servilletas húmedas dobladas a la mitad. Cubrir las servilletas con una capa de papel de aluminio. Cubrir la capa de papel aluminio con papel *parafilm*.
- Colocar una mosca sobre la tapa de la caja *petri* forrada y macerar con 5 µl de solución amortiguadora de lisis (ver cuadro a continuación) con cuidado de no romper el papel *parafilm*.
- Agregue 35 µl de solución amortiguadora de lisis a la solución macerada y recupere todo el contenido a un tubo previamente rotulado.
- Calentar por 15 minutos a 60 °C y luego 10 minutos a 80° C.
- Colocar las muestras en hielo durante 5 minutos.
- Mantener las muestras a 4 °C si van a ser utilizadas durante los próximos tres días o almacenarlas a -20 °C.

Reactivos y volúmenes para preparación de 1 ml de solución amortiguadora de lisis

Reactivo	Volumen
1.0 M Tris - HCl pH 8.0	5 µl
0.5 M EDTA pH 8.0	1 µl
Nonident - P40	5 µl
Proteinasa K 20 mg/ml	50 µl
Agua destilada	939 µl
Volumen total	1000 µl

Nota: El buffer de lisis debe mantenerse en hielo cuando está en uso y debe almacenarse siempre a 4 °C.

C. Amplificación del gen Citocromo Oxidasa I (COI)

- Realizar la cantidad necesaria de solución de reacción mezclando el volumen de los reactivos necesarios para realizar la PCR (ver cuadro a continuación).

Preparación de la solución (*master mix*) PCR-COI

Reactivo	Concentración	Volumen
Agua dd		9.85 μ l
Buffer	5X	5.0 μ l
MgCl ₂	25 mM	2.5 μ l
Cebador Mtd10	25 mM	0.75 μ l
Cebador Mtd12	25 mM	0.75 μ l
DNTP's	2.5 mM	1.5 μ l
Tap poly	5 U/ μ l	0.15 μ l
ADN		4.5 μ l
Volumen total		25 μ l

- La secuencia de los cebadores se presenta en el cuadro a continuación.

Secuencia de los cebadores para la amplificación del gen COI

Nombre	Secuencia 5`-3`
Mtd 10	TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT
Mtd 12	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA

- Agregar 21 μ l de solución de reacción en el tubo de cada muestra.
- Agregar 4 μ l de la extracción de ADN de cada muestra en su respectivo tubo para completar los 25 μ l de la PCR.
- Asegurar que el volumen de reacción total esté en el fondo del tubo. Para esto se puede centrifugar los tubos en un máximo de 5 segundos.
- Ingresar el programa de ciclos y temperaturas en el termociclador (ver cuadro a continuación).

Programa para la amplificación del gen COI

Paso	Ciclos	Nombre	Temp.	Tiempo
1	1	Desnaturalización	95°C	2 min
2	30	Desnaturalización	95°C	1 min
3		Hibridización	52°C	1 min
4		Amplificación	72°C	1 min
5	1	Terminación	72°C	10 min
6	1	Hold	4°C	Infinito

- Ingresar las muestras al termociclador y esperar a que se realice la PCR.
- Retirar las muestras del termociclador y sumergirlas en hielo.
- Correr las muestras en un gel de agarosa al 1% y verificar la amplificación con tinción de bromuro de etidio.

D. Comprobación de los productos de PCR en geles de agarosa al 1%

- Preparar un gel de agarosa al 1 % (ver cuadro a continuación).

Preparación del gel de agarosa al 1% para visualizar productos de PCR

Reactivo	Cantidad
Agarosa	0.30 g
Buffer TAE 1X	30 ml
Volumen total	30 ml

Disolver la *agarosa* aplicando calor hasta ebullición. La solución debe quedar transparente.

- Sumergir el gel en solución de solución amortiguadora TAE 1X (ver cuadro a continuación).

Preparación de solución amortiguadora TAE 50X

Reactivo	Cantidad
Tris base	242.0 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	100.0 ml

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	842.9 ml
Volumen total	1000 ml

Esterilizar y guardar la solución a 4 °C. Utilizar para preparar solución amortiguadora TAE 1X.

- Cargar 5 μ l de producto de PCR mezclado con 1 μ l de buffer de montaje en los diferentes pozos del gel.
- Recuerde siempre cargar marcador de peso y controles positivo y negativo.
- Conectar la cámara de electroforesis a una fuente de poder entre 85 y 90 voltios por 40 minutos.
- Sumergir el gel en bromuro de etidio por 5 a 10 minutos en constante agitación
- Sumergir el gel en agua por 5 minutos en constante agitación para eliminar el exceso de tinción.
- Ingresar el gel a la cámara del transluminador y revelar las bandas aplicando luz ultravioleta.
- Tomar una foto, guardarla y apuntar el número de localización.

E. Polimorfismo de la conformación de una sola banda de ADN

- Lavar las placas de vidrio y los espaciadores con agua y jabón.
- Quitar el remanente de jabón con agua destilada.
- Limpiar con isopropanol al 100% y deje secar por 10 minutos.
- Armar el sistema de polimerización juntando las respectivas placas de vidrio con sus espaciadores. Sellar bien las esquinas para no permitir escapar líquidos.
- Preparar la solución de poliacrilamida al 10 % (ver cuadro a continuación).

Preparación de solución de poliacrilamida al 10%

Reactivo	Volumen
Agua destilada	7.626 ml
TBE 10X	0.6 ml
Glicerol	0.6 ml
Poliacrilamida 38%	3.15 ml
TEMED	16.0 μ l
APS 25%	16.0 μ l

Reactivo	Volumen
Volumen total	12.0 ml

Primero mezclar bien, tratando de no agregar burbujas, la solución de agua destilada, TBE 10X, Glicerol y Poliacrilamida al 38%. Degasificar por 20 minutos. Agregue de último el TEMED y APS 25% ya que éstos son los agentes que polimerizan la solución. El volumen total puede utilizarse para preparar un total de dos geles en el sistema de electroforesis vertical marca BIORAD *miniprotean* II y III de 0.75 mm de espesor entre las placas.

- Verter la solución dentro de las placas de vidrio, inmediatamente después de agregar TEMED y APS 25% (ver cuadro a continuación).

Preparación de solución de persulfato de amonio (APS) 25% w/v

Reactivo	Cantidad
APS	62.5 mg
Agua destilada	250.0 μ l
Volumen total	250.0 μ l

Almacenar a -20 °C en un tubo de 1.5 μ l.

- Colocar los respectivos peines tratando de que no quede ninguna burbuja y espere al menos 20 minutos para que polimerice el gel.
- Armar el sistema de electroforesis colocando las placas de vidrio y los geles sumergidos en solución amortiguadora TBE 10X (ver cuadro a continuación).

Preparación de solución amortiguadora TBE 10X

Reactivo	Cantidad
Tris base	54.0 g
Ácido bórico	27.5 g
0.05 M EDTA pH 8.0	20.0 ml
Agua destilada	980.0 ml

Mezclar con calor. Almacenar a temperatura ambiente.

- Preparar cada muestra agregando a un nuevo tubo 5 μ l de producto de PCR más 7 μ l de buffer de montaje desnaturizante.

- Calentar la muestra a 95 °C por 10 minutos.
- Sumergir inmediatamente en hielo por al menos 10 minutos.
- Cargue de 7 a 10 μ l de muestra en su respectivo pozo dentro del gel de poliacrilamida.
- No olvide cargar uno a dos pozos con 3 μ l de marcador de peso.
- Cierre el sistema de electroforesis y colóquelo en baño de hielo.
- Conecte el sistema de electroforesis a una fuente de poder y corra los geles a 30 miliamperios constantes y máxima potencia (500 voltios) por 4 horas (240 minutos) mínimas aproximadamente.

F. Protocolo de la revelación de polimorfismos por tinción de plata

- Incubar los geles de poliacrilamida en 100 ml de ácido acético al 10% por 30 minutos en constante agitación.
- Lavar cuatro veces los geles con 150 ml de agua destilada desmineralizada, agitando y cambiando el agua cada 2 minutos de lavado.
- Incubar agitando por 30 minutos en 150 ml de solución de nitrato de plata (ver cuadro a continuación).

Preparación de solución de nitrato de plata

Reactivo	Cantidad
Nitrato de plata	0.150 g
Agua destilada	149.392 ml
Formaldehído 37%	0.608 μ l
Volumen total	150 ml

Agregar el formaldehído 37% justo antes de utilizar la solución

- Lavar agitando por 15 segundos en 150 ml de agua destilada desmineralizada.
- Incubar inmediatamente en solución de carbonato de sodio (ver cuadro a continuación). Agite constantemente hasta que se hagan visibles todas las bandas. Pare la reacción agregando los 100 ml de ácido acético 10% (la misma solución que se utilizó para la primera incubación). Agite la solución hasta que deje de hacer burbujas.

Preparación de solución de carbonato de sodio

Reactivo	Cantidad
Carbonato de sodio	4.5g
Agua destilada	149.8 ml
Tiosulfato de sodio 0.0002% (ver siguiente cuadro)	1.5 µl
Formaldehído 37%	225.0 µl
Volumen total	150.0 ml

La solución debe estar fría antes de utilizarla. Agregar el formaldehído 37 % y tiosulfato de sodio justo antes de utilizar la solución.

Preparación de solución de tiosulfato de sodio al 0.0002%

Reactivo	Cantidad
Tiosulfato de sodio	0.23 g
Agua destilada	500 µl
Volumen total	500 µl

Almacenar a -20 °C en un tubo de 1.5 µl.

- Observar las bandas de mejor manera en un transluminador de luz blanca.
- Guardar los geles en la solución anterior a 4 °C por tiempo indefinido.

G. Desecado de geles de poliacrilamida

- Recortar retazos de papel celofán y cartulina un poco más grandes que el tamaño del gel. Utilizar como base las placas de los vidrios del sistema de electroforesis.
- Remojar la base de cartulina en la solución desecadora (ver cuadro a continuación) y remover el exceso.

Preparación de solución desecadora de geles

Reactivo	Volumen
Ácido acético glacial	200.0 ml
Glicerol	50.0 ml

Reactivo	Volumen
Metanol	100.0 ml

Aforar a 500 ml con agua destilada desmineralizada. Utilizar la solución tantas veces sea necesaria hasta que deje de ser transparente.

- Coloque su gel de poliacrilamida sobre la base de cartulina de forma centrada. Trate de que no quede ninguna burbuja entre el gel y la cartulina.
- Remojar la base de papel celofán en la solución desecadora y remover el exceso.
- Coloque la base de papel celofán sobre el gel de poliacrilamida. Extienda el papel celofán a lo largo del gel.
- Trate de eliminar cualquier burbuja que haya quedado atrapada.
- Colocar el gel dentro de la desecadora y cúbralo con el cobertor de plástico. Si se va a desecar más de uno, tratar de que no queden sobrepuestos.
- Conecte la desecadora al vacío a una temperatura constante de 80 °C por 2 horas en gradiente constante.

H. Especificaciones generales de equipo, material y reactivos

Especificaciones generales de equipo utilizado en laboratorio

Nombre español	Nombre inglés	Marca	Modelo	No. serie	Construcción
Bloque térmico	Heat Block	VWR SCIENTIFIC		Cat. No. 13259-005	USA
Termociclador	Mastercycler personal	Eppendorf		533202407	Alemania
Transluminador UV	Bio DOC - IT Imagen System	UVP			Gran Bretaña
Cámara de Electroforesis Horizontal	Horizontal Mini-Gel System	SIGMA	E0638		USA
Fuente de poder	Accu Power	VWR SCIENTIFIC	500		USA
Transluminar luz blanca	Vari Quest 100 white light	FOTODYNE	3-3700	12891214	USA
meecedor	Gyratory shaker	NBS	G-10	961185	USA
Cámara de Electroforesis vertical	Mini protean III	BIORAD	Mini Protean 3 cell	525BR079715	USA
Pipeta 2.5 ul		Eppendorf		2466514	Alemania
Pipeta 2 - 20 ul		Eppendorf		2898067	Alemania
Pipeta 20 - 200 ul		Eppendorf		2860237	Alemania
Pipeta 100 - 1000 ul		Eppendorf		2819387	Alemania
Pesa		OHAUS	Scout Pro SP202	13123	China

Especificaciones generales de reactivos utilizados en laboratorio

Nombre común	Nombre completo	Marca
Tris - HCl	Tris (hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	MERCK
Hidróxido de sodio	Natriumhydroxid	MERCK
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	SIGMA
Proteinasa K	Proteinase K, recombinant PCR grade	Roche diagnostics
Marcador 1 Kbp	1 Kb DNA ladder	PROMEGA
Marcador 0.12 - 23.1 Kbp	DNA ladder 0.12 - 23.1 Kbp	Roche diagnostics
Buffer de PCR	5x colorless Gotaq Flexi Buffer	PROMEGA
Cloruro de Magnesio	MgCl ₂ 25mM	PROMEGA
dGTP	dGTP 100 mM	PROMEGA
dATP	dATP 100 mM	PROMEGA
dCTP	dCTP 100 mM	PROMEGA
dTTP	dTTP 100 mM	PROMEGA
Cebador Mtd10	Primer Mtd10 42.1 nmol	INVITROGEN
Cebador Mtd12	Primer Mtd12 39.69 nmol	INVITROGEN
Agarosa		PROMEGA
Tris - base	Trizma Base	SIGMA
Ácido acético glacial	Acetic acid, Glacial 100%	J.T. Baker
Bromuro de etidio		SIGMA
Acetato de amonio	Amonium acetate, granular	J.T. Baker
Isopropanol	2-propanol 100%	MERCK
Ácido bórico Granular		J.T. Baker
Glicerol	Glycerol	J.T. Baker
Poliacrilamida	Acrylamide Bis 40% (37.5:1)	MERCK
TEMED		MERCK
Formaldehído	Formaldehyde solution 37% w/w	Fisher Chemicals
Nitrato de plata	Silver nitrate, >99% titration	SIGMA
Carbonato de sodio		MERCK
Tiosulfato de sodio	Sodium thiosulfate, Anhydrous, granular	J.T. Baker

I. Identificación de mosca blanca por sitios de colecta

Muestra	Fecha	Región	Depto.	Altura	Cultivo	Latitud	Longitud	<i>B. tabaci</i>	<i>T. vaporariorum</i>	<i>A. socialis</i>	<i>T. abutilonea</i>	<i>B. tuberculata</i>	No. ID.
1	05/05/2008	Occidente	HUE	1940	tomate	15.36387	-91.4832	0	267	0	0	0	0
2	05/05/2008	Occidente	HUE	1940	tomate	15.36387	-91.4832	0	235	0	0	0	0
3	05/05/2008	Occidente	HUE	1940	pepino	15.36387	-91.4832	0	145	0	0	0	0
4	05/05/2008	Occidente	HUE	2523	papa	15.39128	-91.4537	0	26	0	0	0	0
5	05/05/2008	Occidente	HUE	2523	chilacayote	15.39129	-91.4537	0	456	0	0	0	0
6	05/06/2008	Occidente	SMAR	2239	frijol	14.94121	-91.7521	0	78	0	0	0	0
7	05/06/2008	Occidente	SMAR	2039	tomate	14.94121	-91.7521	0	290	0	0	0	0
8	05/06/2008	Occidente	SMAR	2501	tomate	14.97713	-91.7994	0	145	0	0	0	0
9	05/06/2008	Occidente	SMAR	2492	papa	14.96485	-91.8231	0	16	0	0	0	0
10	05/06/2008	Occidente	SMAR	2492	güicoy	14.96485	-91.8231	0	148	0	0	0	0
11	05/06/2008	Occidente	SMAR	2366	tomate	14.96485	-91.8231	0	264	0	0	0	0
12	05/06/2008	Occidente	QUET	2875	tomate	14.8856	-91.6635	0	199	0	0	0	0
13	05/06/2008	Occidente	QUET	2875	chile	14.8856	-91.6635	0	121	0	0	0	0
14	05/06/2008	Occidente	QUET	2875	güicoy	14.8856	-91.6635	0	167	0	0	0	0
15	05/07/2008	Occidente	QUET	2420	tomate	14.86274	-91.5537	0	356	0	0	0	0
16	05/07/2008	Occidente	QUET	2420	güicoy	14.86274	-91.5537	0	345	0	0	0	0
17	05/07/2008	Occidente	QUET	2403	maleza	14.87061	-91.5135	0	46	0	0	0	0
18	05/07/2008	Occidente	QUET	2403	miltomate	14.87062	-91.5135	0	123	0	0	0	0
19	05/07/2008	Occidente	QUET	2403	sandia	14.87063	-91.5135	0	46	0	0	0	0
20	05/07/2008	Occidente	QUET	2403	güicoy	14.87064	-91.5135	0	26	0	0	0	0
21	05/07/2008	Occidente	QUET	2403	papa	14.87065	-91.5135	0	12	0	0	0	0
22	05/08/2008	Occidente	TOTO	2394	tomate	14.87556	-91.3695	0	178	0	0	0	0
23	05/08/2008	Occidente	TOTO	2394	güicoy	14.87556	-91.3695	0	134	0	0	0	0
24	05/08/2008	Occidente	TOTO	2564	maleza	14.86728	-91.3778	0	67	0	0	0	0
25	05/08/2008	Occidente	TOTO	2568	maleza	14.86728	-91.3778	0	43	0	0	0	0
26	05/09/2008	Occidente	SOLO	2311	tomate	14.80067	-91.2507	0	137	0	0	0	0
27	05/09/2008	Occidente	SOLO	2332	tomate	14.79908	-91.2534	0	367	0	0	0	0
28	05/09/2008	Occidente	SOLO	2082	frijol	14.76298	-91.1695	0	87	0	0	0	0
29	05/09/2008	Occidente	SOLO	2082	clavel	14.76298	-91.1695	0	356	0	0	0	0
30	05/09/2008	Occidente	SOLO	2082	maleza	14.76298	-91.1695	0	34	0	0	0	0
31	05/09/2008	Occidente	SOLO	2086	frijol	14.74988	-91.1435	0	58	0	0	0	0

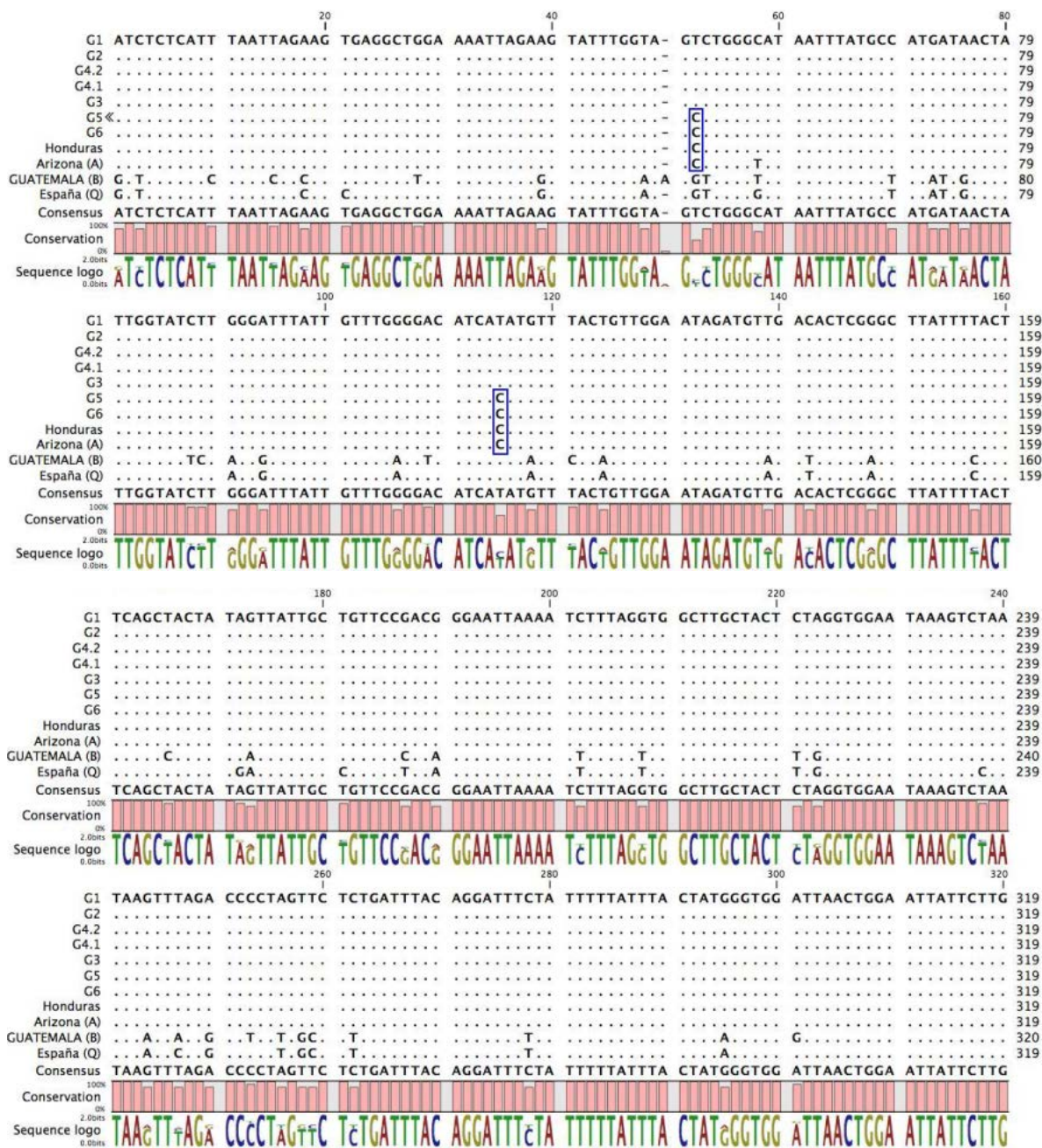
Muestra	Fecha	Región	Depto.	Altura	Cultivo	Latitud	Longitud	<i>B. tabaci</i>	<i>T. vaporariorum</i>	<i>A. socialis</i>	<i>T. abutilonea</i>	<i>B. tuberculata</i>	No. ID.
32	05/09/2008	Occidente	SOLO	1876	tomate	14.65395	-91.1211	0	98	0	0	0	0
33	05/09/2008	Occidente	SOLO	1876	maleza	14.65395	-91.1211	0	25	0	0	0	0
34	05/09/2008	Occidente	SOLO	2254	tomate	14.72341	-91.1057	0	376	0	0	0	0
35	05/10/2008	Occidente	CHIM	2289	frijol	14.74616	-90.9676	0	149	0	0	0	0
36	05/10/2008	Occidente	CHIM	2139	güicoy	14.6739	-90.9518	0	57	0	0	0	0
37	05/12/2008	Sur	RETAL	52	sandia	14.37466	-91.8082	15	0	0	1	0	2
38	05/12/2008	Sur	RETAL	84	papaya	14.45837	-91.8031	12	0	0	0	34	0
39	05/12/2008	Sur	RETAL	32	papaya	14.52088	-91.9354	0	0	0	0	63	0
40	05/12/2008	Sur	RETAL	56	maleza	14.49287	-91.8945	23	0	0	1	39	7
41	05/12/2008	Sur	RETAL	300	papaya	14.55846	-91.7383	13	0	0	3	0	8
42	05/13/2008	Sur	QUET	200	tabaco	14.70308	-92.0348	21	0	0	0	0	5
43	05/13/2008	Sur	SMAR	90	papaya	14.58153	-92.1436	0	0	0	0	48	0
44	05/13/2008	Sur	RETAL	10	papaya	14.54648	-92.0794	0	0	0	0	59	1
45	05/13/2008	Sur	RETAL	26	maleza	14.359	-91.8799	18	0	1	0	0	1
46	05/13/2008	Sur	RETAL	30	maleza	14.37084	-91.8752	13	0	0	0	0	2
47	05/14/2008	Sur	SUCHI	110	maleza	14.32769	-91.8752	15	0	0	0	3	0
48	05/14/2008	Sur	SUCHI	57	papaya	14.19878	-91.5494	0	0	0	0	69	0
49	05/14/2008	Sur	SUCHI	56	maleza	14.21846	-91.6052	11	0	0	0	3	1
50	05/14/2008	Sur	SUCHI	50	papaya	14.28231	-91.6156	0	0	0	0	44	0
51	03/30/2008	Norte	PETEN	169	chile	16.900158	-89.8851	470	0	0	0	0	0
52	03/30/2008	Norte	PETEN	169	yuca	16.900158	-89.8851	0	0	0	43	0	0
53	03/30/2008	Norte	PETEN	169	tomate	16.900158	-89.8851	573	0	0	0	0	0
54	03/30/2008	Norte	PETEN	213	chile	16.80159	-89.8186	346	0	0	0	0	0
55	03/30/2008	Norte	PETEN	155	tomate	16.908025	-89.9722	657	0	0	0	0	0
1572	03/07/2008	Centro	BAJV	975	chile	15.12333	-90.3228	26	8	0	0	0	0
1574	03/07/2008	Oriente	PROG	878	tomate	14.81417	-90.1828	13	4	0	0	0	0
1597	03/14/2008	Oriente	CHIQ	369	pepino	14.815	-89.5344	75	0	0	0	0	0
1599	03/14/2008	Oriente	CHIQ	376	tomate	14.76861	-89.5483	227	0	0	0	0	0
1601	03/14/2008	Oriente	CHIQ	364	chile	14.79222	-89.5258	18	0	0	0	0	0
1605	03/14/2008	Oriente	ZAC	216	chile	14.93639	-89.5242	23	0	0	1	0	0
1608	03/14/2008	Oriente	ZAC	159	tomate	15.09389	-89.3706	48	0	0	0	0	0
1611	03/25/2008	Centro	BAJV	971	tomate	15.11417	-90.3453	92	4	0	0	0	0
1631	04/09/2008	Oriente	JUT	1077	chile	14.41806	-89.8217	55	0	0	0	0	0
1639	04/10/2008	Oriente	JUT	571	tomate	14.25667	-89.7453	25	1	0	0	0	0

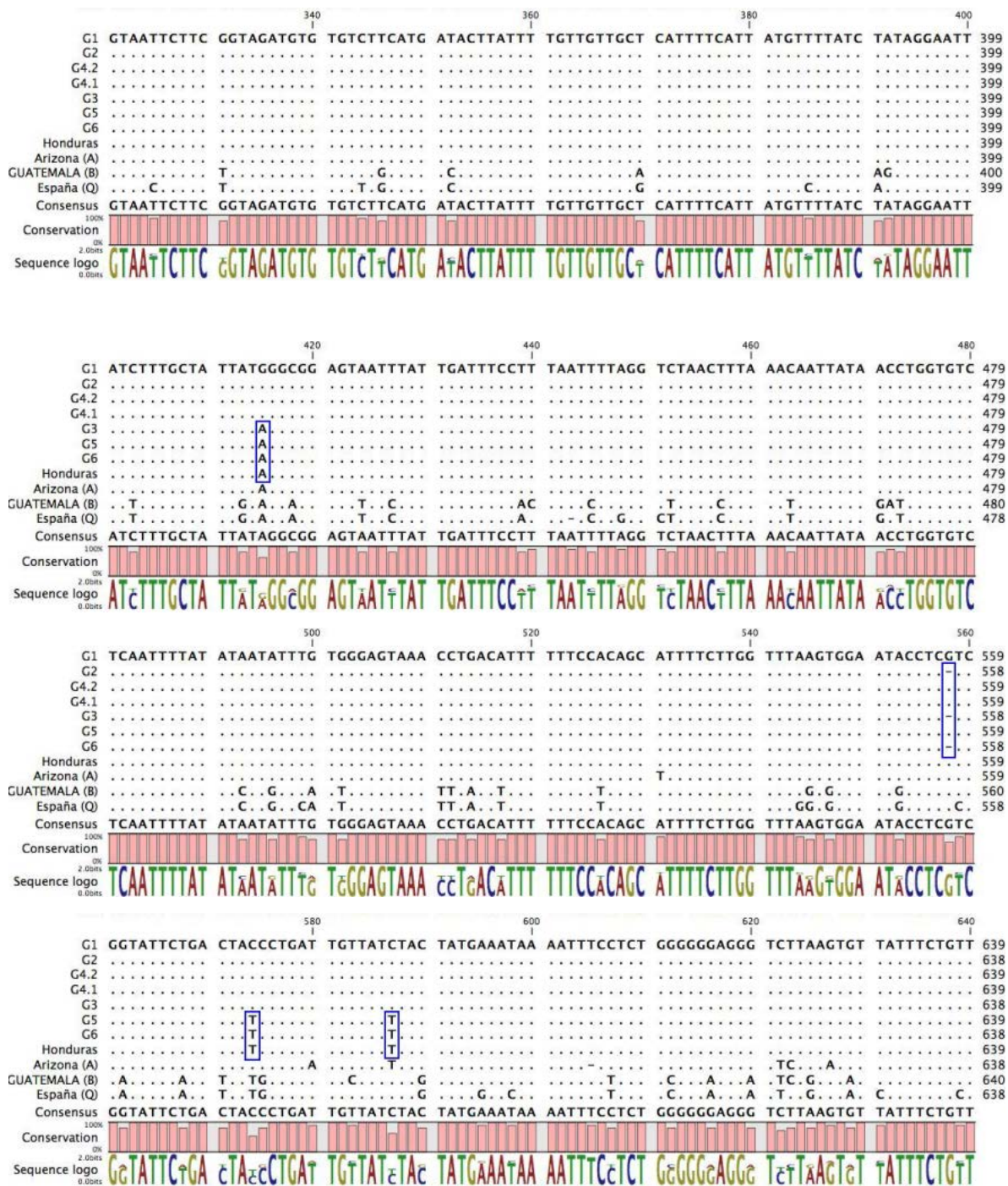
Muestra	Fecha	Región	Depto.	Altura	Cultivo	Latitud	Longitud	<i>B. tabaci</i>	<i>T. vaporariorum</i>	<i>A. socialis</i>	<i>T. abutilonea</i>	<i>B. tuberculata</i>	No. ID.
1640	04/29/2008	Centro	BAJV	1055	papa	15.06222	-90.2772	25	22	0	0	0	0
1654	04/29/2008	Oriente	SROS	1422	tomate	14.50028	-90.1778	20	10	0	1	0	0
1655	04/29/2008	Centro	GUA	1217	chile	14.47556	-90.6261	20	0	0	0	0	0
906	03/01/2007	Oriente	ZAC	200	melón	14.9363	-89.5242	69	0	0	0	0	0
908	03/08/2007	Oriente	SROS	1200	tomate	14.40889	-90.2589	35	4	0	0	0	0
913	03/07/2007	Centro	GUA	1213	chile	14.52694	-90.5631	52	13	0	0	0	1
915	03/07/2007	Centro	GUA	1213	tomate	14.52694	-90.5631	21	12	0	0	0	0
940	04/02/2007	Oriente	JUT	1077	chile	14.41806	-89.8217	85	6	0	0	0	0
944	04/03/2007	Oriente	JUT	470	chile	14.29861	-89.7069	143	0	0	0	0	0
945	04/03/2007	Oriente	JUT	470	tomate	14.29861	-89.7069	102	7	0	0	0	0
946	04/02/2007	Oriente	JAL	1025	tomate	14.47778	-89.8708	29	3	0	0	0	0
965	04/13/2007	Oriente	ZAC	200	melón	14.93639	-89.5242	569	0	0	0	0	0
973	04/14/2007	Oriente	SROS	1010	tomate	14.40889	-90.2589	33	13	0	0	0	0
978	04/15/2007	Centro	GUA	1217	chile	14.47556	-90.6261	68	2	0	0	0	0
980	04/16/2007	Centro	GUA	1213	tomate	14.52694	-90.5631	64	4	0	0	0	0
985	04/26/2007	Centro	BAJV	975	tomate	15.12333	-90.3228	34	6	0	0	0	0
1349	11/08/2007	Oriente	JAL	963	tomate	14.54194	-89.8731	52	8	0	0	1	1
1370	11/22/2007	Oriente	CHIQ	963	tomate	14.66	-89.2869	41	0	0	0	0	0
1380	11/21/2007	Oriente	CHIQ	564	chile	14.750231	89.24095	90	0	0	0	0	0
1384	11/22/2007	Oriente	CHIQ	927	pepino	14.6	-89.3017	16	0	0	0	0	1
1387	11/29/2007	Centro	BAJV	971	tomate	15.11417	-90.3453	49	4	0	0	0	0
1389	11/29/2007	Centro	BAJV	971	chile	15.11417	-90.3453	40	79	0	0	0	0
1422	12/04/2007	Oriente	CHIQ	900	otras	14.616089	-89.5836	32	0	0	2	0	0
1432	12/05/2007	Oriente	CHIQ	950	otras	14.59972	-89.3397	28	0	0	0	0	0
1436	12/10/2007	Oriente	ZAC	216	chile	14.93639	-89.5242	58	0	0	0	0	0
1438	12/11/2007	Oriente	CHIQ	564	otras	14.750231	89.24095	72	0	0	0	0	0
1455	12/19/2007	Centro	BAJV	1055	chile	15.06222	-90.2772	34	10	0	0	0	0
267	03/14/2006	Oriente	CHIQ	945	tomate	14.59972	-89.3397	76	227	0	0	0	0
269	03/15/2006	Oriente	ZAC	903	otras	14.5275	-89.6083	53	0	0	1	0	0
273	03/16/2006	Oriente	CHIQ	376	chile	14.76861	-89.5483	610	0	0	0	0	0
274	03/16/2006	Oriente	CHIQ	388	tomate	14.76278	-89.5214	162	0	0	0	0	0
279	03/22/2006	Oriente	JUT	1077	otras	14.41806	-89.8217	39	238	0	0	0	0
280	03/21/2006	Oriente	JUT	571	chile	14.25667	-89.7453	31	0	0	56	0	0
283	03/23/2006	Oriente	JAL	963	pepino	14.54194	-89.8731	157	35	0	0	0	0

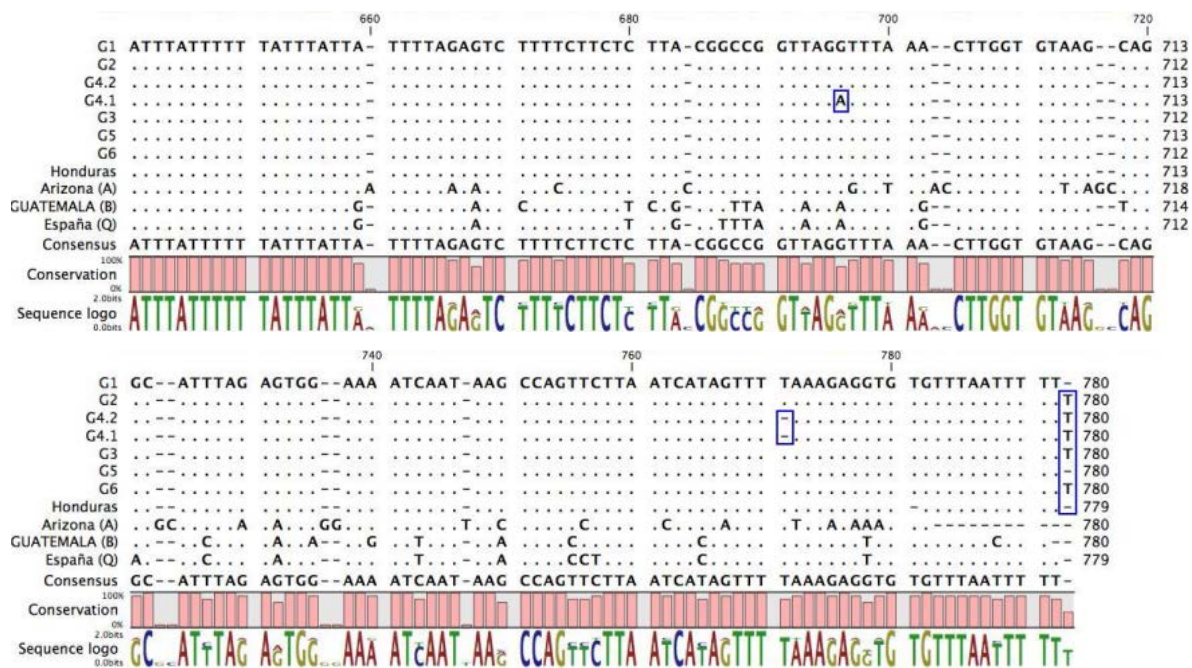
Muestra	Fecha	Región	Depto.	Altura	Cultivo	Latitud	Longitud	<i>B. tabaci</i>	<i>T. vaporariorum</i>	<i>A. socialis</i>	<i>T. abutilonea</i>	<i>B. tuberculata</i>	No. ID.
286	03/23/2006	Oriente	SROS	1422	tomate	14.50028	-90.1778	68	75	0	0	0	0
288	03/29/2006	Centro	GUA	1225	tomate	14.49528	-90.5836	34	103	0	0	0	0
300	04/04/2006	Centro	BAJV	971	tomate	15.11417	-90.3453	79	3	0	0	0	0
311	04/05/2006	Oriente	JAL	963	pepino	14.54194	-89.8731	113	19	0	0	0	0
313	04/07/2006	Oriente	SROS	1024	maleza	14.38667	-90.3294	26	8	0	0	0	0
326	04/19/2006	Oriente	CHIQ	376	chile	14.76861	-89.54833	51	0	0	0	0	0
331	04/20/2006	Oriente	CHIQ	945	maleza	14.59972	-89.3397	158	12	0	3	0	0
332	04/25/2006	Centro	GUA	1225	tomate	14.49528	-90.5836	33	81	0	0	0	0
627	11/08/2006	Oriente	ZAC	904	tomate	14.51917	-89.60972	29	3	1	0	0	7
633	11/09/2006	Oriente	CHIQ	376	tomate	14.76861	-89.5483	25	1	0	0	0	0
634	11/09/2006	Oriente	CHIQ	376	chile	14.76861	-89.5483	54	0	0	0	0	0
651	11/09/2006	Oriente	ZAC	159	melón	15.09389	-89.3706	119	0	0	0	0	0
672	11/23/2006	Oriente	JAL	1034	tomate	14.47861	-89.8908	47	8	0	0	0	0
695	12/05/2006	Oriente	CHIQ	900	tomate	14.616089	-89.5836	34	0	0	8	0	0
705	12/06/2006	Oriente	CHIQ	937	chile	14.62139	-89.30444	33	5	0	0	0	0
722	12/14/2006	Oriente	SROS	1010	chile	14.40889	-90.2589	20	2	0	0	1	1
724	12/12/2006	Centro	GUA	1213	chile	14.52694	-90.5631	32	0	0	0	0	0
741	12/22/2006	Centro	BAJV	971	tomate	15.11417	-90.3453	68	0	0	0	0	0
751	12/23/2006	Oriente	PROG	878	tomate	14.81417	-90.1828	28	32	0	2	0	0

Depto: Departameto; PROG: El Progreso; BAJV: Baja Verapaz; GUA: Guatemala; SROS: Santa Rosa; CHIQ: Chiquimula; JAL: Jalapa; ZAC: Zacapa; CHIQ: Chiquimula; HUE: Huehuetenango; JUT: Jutiapa; SUCHI: Suchitepéquez; RETAL: Retalhuleu; CHIM: Chimaltenango; SOLO: Sololá; SMAR: San Marcos; QUET: Quetzaltenango; TOTO: Totonicapán

J. Comparación de secuencias de los diferentes biotipos registrados







K. Identificación de biotipos de *B. tabaci*

Muestra	Temporada	Región	Año	Cultivo	Altura	CO1	Biotipo
267a	seca	Oriente	2006	tomate	945	+	G1
267b	seca	Oriente	2006	tomate	945	+	*
267c	seca	Oriente	2006	tomate	945	+	G1
267d	seca	Oriente	2006	tomate	945	+	G1
267e	seca	Oriente	2006	tomate	945	+	*
269a	seca	Oriente	2006	otras	903	+	G1
269b	seca	Oriente	2006	otras	903	+	G1
269c	seca	Oriente	2006	otras	903	+	G1
269d	seca	Oriente	2006	otras	903	+	*
269e	seca	Oriente	2006	otras	903	+	*
273a	seca	Oriente	2006	chile	376	+	G1
273b	seca	Oriente	2006	chile	376	+	*
273c	seca	Oriente	2006	chile	376	+	*
273d	seca	Oriente	2006	chile	376	+	*
273e	seca	Oriente	2006	chile	376	+	*
274a	seca	Oriente	2006	tomate	388	+	*
274b	seca	Oriente	2006	tomate	388	+	*
274c	seca	Oriente	2006	tomate	388	+	*
274d	seca	Oriente	2006	tomate	388	+	G1
274e	seca	Oriente	2006	tomate	388	+	G1
279a	seca	Oriente	2006	otras	1077	+	*
279b	seca	Oriente	2006	otras	1077	+	G1
279c	seca	Oriente	2006	otras	1077	+	G1
279d	seca	Oriente	2006	otras	1077	+	G1
279e	seca	Oriente	2006	otras	1077	+	G1
280a	seca	Oriente	2006	chile	571	+	G1
280b	seca	Oriente	2006	chile	571	-	*
280c	seca	Oriente	2006	chile	571	+	G1
280d	seca	Oriente	2006	chile	571	+	G1
280e	seca	Oriente	2006	chile	571	-	*
283a	seca	Oriente	2006	pepino	963	+	*
283b	seca	Oriente	2006	pepino	963	+	G1
283c	seca	Oriente	2006	pepino	963	+	G1
283d	seca	Oriente	2006	pepino	963	+	G1
283e	seca	Oriente	2006	pepino	963	+	G1
286a	seca	Oriente	2006	tomate	1422	-	*

Muestra	Temporada	Región	Año	Cultivo	Altura	CO1	Biotipo
286b	seca	Oriente	2006	tomate	1422	+	G1
286c	seca	Oriente	2006	tomate	1422	+	G1
286d	seca	Oriente	2006	tomate	1422	+	*
286e	seca	Oriente	2006	tomate	1422	+	G1
311a	seca	Oriente	2006	pepino	963	+	G1
311b	seca	Oriente	2006	pepino	963	+	G1
311c	seca	Oriente	2006	pepino	963	+	G1
311d	seca	Oriente	2006	pepino	963	+	*
311e	seca	Oriente	2006	pepino	963	+	G1
313a	seca	Oriente	2006	maleza	1024	+	G1
313b	seca	Oriente	2006	maleza	1024	+	*
313c	seca	Oriente	2006	maleza	1024	+	G1
313d	seca	Oriente	2006	maleza	1024	+	G1
313e	seca	Oriente	2006	maleza	1024	+	*
326a	seca	Oriente	2006	chile	376	-	*
326b	seca	Oriente	2006	chile	376	-	*
326c	seca	Oriente	2006	chile	376	+	G1
326d	seca	Oriente	2006	chile	376	+	G1
326e	seca	Oriente	2006	chile	376	+	G1
331a	seca	Oriente	2006	maleza	945	+	G1
331b	seca	Oriente	2006	maleza	945	+	G1
331c	seca	Oriente	2006	maleza	945	+	G1
331d	seca	Oriente	2006	maleza	945	+	G1
331e	seca	Oriente	2006	maleza	945	+	G1
288a	seca	Centro	2006	tomate	1225	-	*
288b	seca	Centro	2006	tomate	1225	-	*
288c	seca	Centro	2006	tomate	1225	-	*
288d	seca	Centro	2006	tomate	1225	-	*
288e	seca	Centro	2006	tomate	1225	-	*
300a	seca	Centro	2006	tomate	971	-	*
300b	seca	Centro	2006	tomate	971	-	*
300c	seca	Centro	2006	tomate	971	-	*
300d	seca	Centro	2006	tomate	971	-	*
300e	seca	Centro	2006	tomate	971	-	*
332a	seca	Centro	2006	tomate	1225	+	G1
332b	seca	Centro	2006	tomate	1225	+	*
332c	seca	Centro	2006	tomate	1225	+	G1
332d	seca	Centro	2006	tomate	1225	+	G1

Muestra	Temporada	Región	Año	Cultivo	Altura	CO1	Biotipo
332e	seca	Centro	2006	tomate	1225	+	*
627a	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	904	+	G5
627b	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	904	+	*
627c	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	904	+	G5
627d	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	904	+	*
627e	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	904	+	G5
633 ^a	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	376	+	G5
633b	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	376	+	*
633c	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	376	+	*
633d	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	376	+	*
633e	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	376	+	*
634 ^a	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	376	+	*
634b	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	376	-	*
634c	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	376	-	*
634d	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	376	+	*
634e	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	376	-	*
651 ^a	Después de lluvia	Oriente	2006	melón	140	-	*
651b	Después de lluvia	Oriente	2006	melón	140	-	*
651c	Después de lluvia	Oriente	2006	melón	140	-	*
651d	Después de lluvia	Oriente	2006	melón	140	-	*
651e	Después de lluvia	Oriente	2006	melón	140	-	*
672 ^a	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	1034	+	G3
672b	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	1034	+	G3
672c	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	1034	+	G3
672d	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	1034	+	*
695a	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	900	+	G5
695b	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	900	+	G5
695c	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	900	+	*
695d	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	900	+	*
695e	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	900	+	*
705a	Después de lluvia	Oriente	2006	tomate	937	+	*
705b	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	937	+	G1
705c	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	937	+	*
705d	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	937	+	G1
705e	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	937	+	G1
722a	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	1010	+	G1
722b	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	1010	-	*
722c	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	1010	+	*

Muestra	Temporada	Región	Año	Cultivo	Altura	CO1	Biotipo
722d	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	1010	-	*
722e	Después de lluvia	Oriente	2006	chile	1010	+	G1
724a	Después de lluvia	Centro	2006	chile	1213	+	G1
724b	Después de lluvia	Centro	2006	chile	1213	+	G1
724c	Después de lluvia	Centro	2006	chile	1213	+	G1
724d	Después de lluvia	Centro	2006	chile	1213	+	G1
724e	Después de lluvia	Centro	2006	chile	1213	+	G1
741a	Después de lluvia	Centro	2006	tomate	971	+	G1
741b	Después de lluvia	Centro	2006	tomate	971	+	G1
741c	Después de lluvia	Centro	2006	tomate	971	+	G1
741d	Después de lluvia	Centro	2006	tomate	971	+	G1
741e	Después de lluvia	Centro	2006	tomate	971	+	G1
751a	Después de lluvia	Centro	2006	tomate	878	+	G1
751b	Después de lluvia	Centro	2006	tomate	878	+	G1
751c	Después de lluvia	Centro	2006	tomate	878	+	G1
751d	Después de lluvia	Centro	2006	tomate	878	+	*
751e	Después de lluvia	Centro	2006	tomate	878	+	*
906a	seca	Oriente	2007	melón	200	-	*
906b	seca	Oriente	2007	melón	200	-	*
906c	seca	Oriente	2007	melón	200	-	*
906d	seca	Oriente	2007	melón	200	-	*
906e	seca	Oriente	2007	melón	200	-	*
940a	seca	Oriente	2007	chile	1077	+	G1
940b	seca	Oriente	2007	chile	1077	+	G1
940c	seca	Oriente	2007	chile	1077	+	G1
940d	seca	Oriente	2007	chile	1077	+	G1
940e	seca	Oriente	2007	chile	1077	+	G1
944a	seca	Oriente	2007	chile	470	+	G1
944b	seca	Oriente	2007	chile	470	+	G1
944c	seca	Oriente	2007	chile	470	+	G1
944d	seca	Oriente	2007	chile	470	+	G1
944e	seca	Oriente	2007	chile	470	-	*
945a	seca	Oriente	2007	tomate	470	+	G1
945b	seca	Oriente	2007	tomate	470	+	G1
945c	seca	Oriente	2007	tomate	470	+	G1
945d	seca	Oriente	2007	tomate	470	+	G1
945e	seca	Oriente	2007	tomate	470	+	G1
946a	seca	Oriente	2007	tomate	1025	+	G1

Muestra	Temporada	Región	Año	Cultivo	Altura	CO1	Biotipo
946b	seca	Oriente	2007	tomate	1025	-	*
946c	seca	Oriente	2007	tomate	1025	+	G1
946d	seca	Oriente	2007	tomate	1025	+	G1
965a	seca	Oriente	2007	melón	200	-	*
965b	seca	Oriente	2007	melón	200	-	*
965c	seca	Oriente	2007	melón	200	-	*
965d	seca	Oriente	2007	melón	200	-	*
965e	seca	Oriente	2007	melón	200	-	*
973a	seca	Oriente	2007	tomate	1010	-	*
973b	seca	Oriente	2007	tomate	1010	-	*
973c	seca	Oriente	2007	tomate	1010	-	*
908a	seca	Centro	2007	tomate	1200	+	G1
908b	seca	Centro	2007	tomate	1200	+	G1
908c	seca	Centro	2007	tomate	1200	+	G1
908d	seca	Centro	2007	tomate	1200	+	G1
908e	seca	Centro	2007	tomate	1200	+	G1
913a	seca	Centro	2007	chile	1213	+	G1
913b	seca	Centro	2007	chile	1213	+	G1
913c	seca	Centro	2007	chile	1213	+	G1
913d	seca	Centro	2007	chile	1213	+	G1
913e	seca	Centro	2007	chile	1213	+	G1
915a	seca	Centro	2007	tomate	1213	-	*
915b	seca	Centro	2007	tomate	1213	-	*
915c	seca	Centro	2007	tomate	1213	-	*
915d	seca	Centro	2007	tomate	1213	-	*
915e	seca	Centro	2007	tomate	1213	-	*
978a	seca	Centro	2007	chile	1217	+	G4.1
978b	seca	Centro	2007	chile	1217	-	*
978c	seca	Centro	2007	chile	1217	+	G4.1
978d	seca	Centro	2007	chile	1217	-	*
978e	seca	Centro	2007	chile	1217	-	*
980a	seca	Centro	2007	tomate	1213	+	G4.2
980b	seca	Centro	2007	tomate	1213	+	G4.2
980c	seca	Centro	2007	tomate	1213	-	*
980d	seca	Centro	2007	tomate	1213	-	*
980e	seca	Centro	2007	tomate	1213	+	G4.2
985a	seca	Centro	2007	tomate	975	+	G1
985b	seca	Centro	2007	tomate	975	+	G1

Muestra	Temporada	Región	Año	Cultivo	Altura	CO1	Biotipo
985c	seca	Centro	2007	tomate	975	+	G1
985d	seca	Centro	2007	tomate	975	+	G1
985e	seca	Centro	2007	tomate	975	+	G1
1349a	Después de lluvia	Oriente	2007	tomate	963	+	G1
1349b	Después de lluvia	Oriente	2007	tomate	963	+	G1
1349c	Después de lluvia	Oriente	2007	tomate	963	+	G1
1349d	Después de lluvia	Oriente	2007	tomate	963	+	G1
1349e	Después de lluvia	Oriente	2007	tomate	963	+	G1
1370a	Después de lluvia	Oriente	2007	tomate	963	+	G5
1370b	Después de lluvia	Oriente	2007	tomate	963	+	G5
1370c	Después de lluvia	Oriente	2007	tomate	963	+	G5
1370d	Después de lluvia	Oriente	2007	tomate	963	+	G5
1370e	Después de lluvia	Oriente	2007	tomate	963	-	*
1380a	Después de lluvia	Oriente	2007	chile	564	+	G1
1380b	Después de lluvia	Oriente	2007	chile	564	+	G1
1380c	Después de lluvia	Oriente	2007	chile	564	+	G1
1380d	Después de lluvia	Oriente	2007	chile	564	+	G1
1380e	Después de lluvia	Oriente	2007	chile	564	+	G1
1384a	Después de lluvia	Oriente	2007	pepino	927	+	G1
1384b	Después de lluvia	Oriente	2007	pepino	927	+	G1
1384c	Después de lluvia	Oriente	2007	pepino	927	+	G1
1422a	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	900	+	G5
1422b	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	900	+	G5
1422c	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	900	+	G5
1422d	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	900	+	G5
1422e	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	900	+	G5
1432a	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	950	+	G1
1432b	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	950	+	G1
1432c	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	950	+	G1
1432d	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	950	+	G1
1432e	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	950	+	G1
1436a	Después de lluvia	Oriente	2007	chile	216	+	G1
1436b	Después de lluvia	Oriente	2007	chile	216	+	G1
1436c	Después de lluvia	Oriente	2007	chile	216	+	G1
1436d	Después de lluvia	Oriente	2007	chile	216	+	G1
1436e	Después de lluvia	Oriente	2007	chile	216	+	G1
1438a	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	564	+	G1
1438b	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	564	+	G1

Muestra	Temporada	Región	Año	Cultivo	Altura	CO1	Biotipo
1438c	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	564	+	G1
1438d	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	564	+	G1
1438e	Después de lluvia	Oriente	2007	otras	564	+	G1
1387a	Después de lluvia	Centro	2007	tomate	971	+	G1
1387b	Después de lluvia	Centro	2007	tomate	971	+	G1
1387c	Después de lluvia	Centro	2007	tomate	971	+	G1
1387d	Después de lluvia	Centro	2007	tomate	971	-	*
1387e	Después de lluvia	Centro	2007	tomate	971	-	*
1389a	Después de lluvia	Centro	2007	chile	971	+	G1
1389b	Después de lluvia	Centro	2007	chile	971	+	G1
1389c	Después de lluvia	Centro	2007	chile	971	+	G1
1389d	Después de lluvia	Centro	2007	chile	971	+	G1
1389e	Después de lluvia	Centro	2007	chile	971	+	G1
1455a	Después de lluvia	Centro	2007	chile	1055	+	G1
1455b	Después de lluvia	Centro	2007	chile	1055	+	G1
1455c	Después de lluvia	Centro	2007	chile	1055	+	G1
1455d	Después de lluvia	Centro	2007	chile	1055	+	G1
1455e	Después de lluvia	Centro	2007	chile	1055	+	G1
1597a	seca	Oriente	2008	pepino	369	+	G1
1597b	seca	Oriente	2008	pepino	369	+	G1
1597c	seca	Oriente	2008	pepino	369	-	*
1597d	seca	Oriente	2008	pepino	369	+	G1
1597e	seca	Oriente	2008	pepino	369	+	G1
1599a	seca	Oriente	2008	tomate	376	+	G1
1599b	seca	Oriente	2008	tomate	376	-	*
1599c	seca	Oriente	2008	tomate	376	+	G1
1599d	seca	Oriente	2008	tomate	376	+	G1
1599e	seca	Oriente	2008	tomate	376	+	G1
1601a	seca	Oriente	2008	chile	364	-	*
1601b	seca	Oriente	2008	chile	364	-	*
1601c	seca	Oriente	2008	chile	364	+	G1
1601d	seca	Oriente	2008	chile	364	+	G1
1601e	seca	Oriente	2008	chile	364	+	G1
1605a	seca	Oriente	2008	chile	216	+	G1
1605b	seca	Oriente	2008	chile	216	-	*
1605c	seca	Oriente	2008	chile	216	+	G1
1605d	seca	Oriente	2008	chile	216	-	*
1605e	seca	Oriente	2008	chile	216	+	G1

Muestra	Temporada	Región	Año	Cultivo	Altura	CO1	Biotipo
1608a	seca	Oriente	2008	tomate	159	+	G1
1608b	seca	Oriente	2008	tomate	159	+	G1
1608c	seca	Oriente	2008	tomate	159	+	G1
1608d	seca	Oriente	2008	tomate	159	-	*
1608e	seca	Oriente	2008	tomate	159	-	*
1631a	seca	Oriente	2008	chile	1077	+	G1
1631b	seca	Oriente	2008	chile	1077	+	G1
1631c	seca	Oriente	2008	chile	1077	+	G1
1631d	seca	Oriente	2008	chile	1077	+	G1
1631e	seca	Oriente	2008	chile	1077	+	G1
1639a	seca	Oriente	2008	tomate	571	+	G1
1639b	seca	Oriente	2008	tomate	571	+	G1
1639c	seca	Oriente	2008	tomate	571	+	G1
1639d	seca	Oriente	2008	tomate	571	+	G1
1639e	seca	Oriente	2008	tomate	571	-	*
1654a	seca	Oriente	2008	tomate	1422	+	G1
1654b	seca	Oriente	2008	tomate	1422	+	G1
1654c	seca	Oriente	2008	tomate	1422	+	G1
1654d	seca	Oriente	2008	tomate	1422	+	G1
1654e	seca	Oriente	2008	tomate	1422	+	G1
1572a	seca	Centro	2008	chile	975	+	G1
1572b	seca	Centro	2008	chile	975	+	G1
1572c	seca	Centro	2008	chile	975	+	G1
1572d	seca	Centro	2008	chile	975	+	G1
1572e	seca	Centro	2008	chile	975	+	G1
1574a	seca	Centro	2008	tomate	878	-	*
1574b	seca	Centro	2008	tomate	878	+	G1
1574c	seca	Centro	2008	tomate	878	+	G1
1611a	seca	Centro	2008	tomate	971	-	*
1611b	seca	Centro	2008	tomate	971	-	*
1611c	seca	Centro	2008	tomate	971	-	*
1611d	seca	Centro	2008	tomate	971	-	*
1611e	seca	Centro	2008	tomate	971	-	*
1640a	seca	Centro	2008	papa	1055	+	G1
1640b	seca	Centro	2008	papa	1055	+	G1
1640c	seca	Centro	2008	papa	1055	+	G1
1649d	seca	Centro	2008	papa	1055	+	G1
1640e	seca	Centro	2008	papa	1055	+	G1

Muestra	Temporada	Región	Año	Cultivo	Altura	CO1	Biotipo
1655a	seca	Centro	2008	chile	1217	+	G1
1655b	seca	Centro	2008	chile	1217	+	G1
1655c	seca	Centro	2008	chile	1217	+	G1
1655d	seca	Centro	2008	chile	1217	+	G1
1655e	seca	Centro	2008	chile	1217	+	G1
51a	seca	Norte	2008	chile	169	+	G1
51b	seca	Norte	2008	chile	169	+	G2
51c	seca	Norte	2008	chile	169	+	G2
51d	seca	Norte	2008	chile	169	+	G2
51e	seca	Norte	2008	chile	169	-	*
53a	seca	Norte	2008	tomate	169	+	G1
53b	seca	Norte	2008	tomate	169	-	*
53c	seca	Norte	2008	tomate	169	+	G2
53d	seca	Norte	2008	tomate	169	+	G2
53e	seca	Norte	2008	tomate	169	-	*
54a	seca	Norte	2008	chile	213	+	G2
54b	seca	Norte	2008	chile	213	+	G1
54c	seca	Norte	2008	chile	213	+	G2
54d	seca	Norte	2008	chile	213	+	G2
54e	seca	Norte	2008	chile	213	-	*
55a	seca	Norte	2008	tomate	155	+	G2
55b	seca	Norte	2008	tomate	155	+	G2
55c	seca	Norte	2008	tomate	155	+	G2
55d	seca	Norte	2008	tomate	155	+	G2
55e	seca	Norte	2008	tomate	155	+	G6
37a	seca	Sur	2008	sandía	52	+	G6
37b	seca	Sur	2008	sandía	52	+	G6
37c	seca	Sur	2008	sandía	52	+	G6
37d	seca	Sur	2008	sandía	52	-	*
37e	seca	Sur	2008	sandía	52	+	G6
40a	seca	Sur	2008	tabaco	56	+	G1
40b	seca	Sur	2008	tabaco	56	-	*
40c	seca	Sur	2008	tabaco	56	+	G1
40d	seca	Sur	2008	tabaco	56	+	*
40e	seca	Sur	2008	tabaco	56	+	G1
41a	seca	Sur	2008	papaya	300	+	G3
41b	seca	Sur	2008	papaya	300	+	G3
41c	seca	Sur	2008	papaya	300	+	G3

Muestra	Temporada	Región	Año	Cultivo	Altura	COI	Biotipo
41d	seca	Sur	2008	papaya	300	+	G3
41e	seca	Sur	2008	papaya	300	+	G3
42a	seca	Sur	2008	tabaco	200	+	G3
42b	seca	Sur	2008	tabaco	200	+	G3
42c	seca	Sur	2008	tabaco	200	-	*
42d	seca	Sur	2008	tabaco	200	+	G3
42e	seca	Sur	2008	tabaco	200	+	G3
45a	seca	Sur	2008	papaya	26	+	G3
45b	seca	Sur	2008	papaya	26	+	*
45c	seca	Sur	2008	papaya	26	+	G3
45d	seca	Sur	2008	papaya	26	+	G3
45e	seca	Sur	2008	papaya	26	+	G3
46a	seca	Sur	2008	otra	30	+	G3
46b	seca	Sur	2008	otra	30	-	*
46c	seca	Sur	2008	otra	30	-	*
46d	seca	Sur	2008	otra	30	-	*
46e	seca	Sur	2008	otra	30	+	G3

Los signos positivos indican amplificación de COI mientras que los signos negativos indican una amplificación nula. Sólo las muestras que fueron amplificadas, se logró identificar el biotipo.