

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Incidencia y distribución del begomovirus TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*:  
Geminiviridae) en distintas plantaciones de tomate (*Lycopersicon esculentum*) de la  
República de Guatemala durante época seca

Trabajo de investigación presentado por  
Mónica Alejandra Morales Furlán  
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2010



Incidencia y distribución del begomovirus TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*:  
Geminiviridae) en distintas plantaciones de tomate (*Lycopersicon esculentum*) de la  
República de Guatemala durante época seca

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

Incidencia y distribución del begomovirus TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*:  
Geminiviridae) en distintas plantaciones de tomate (*Lycopersicon esculentum*) de la  
República de Guatemala durante época seca


Trabajo de Investigación presentado por:  
Mónica Alejandra Morales Furlán

para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica y Microbiología


Guatemala


2010

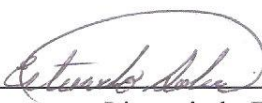
Vo.Bo.:

(f)   
Licenciada Margarita Palmieri

Tribunal:

(f)   
Licenciada Margarita Palmieri

(f)   
Pamela Pennington Ph.D

(f)   
Licenciado Estuardo Solares

Fecha de aprobación: Guatemala 12 de mayo de 2010.

## PREFACIO

La realización de este trabajo, ha sido posible gracias al apoyo financiero dentro del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, -FONACYT-, otorgado por La Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología -SENACYT- y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología -CONCYT-, el Laboratorio de Protección Vegetal del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala y el Laboratorio de Protección de Plantas de la Universidad de Arizona, Tucson, EE.UU.

Quiero agradecer al equipo del Laboratorio de Protección Vegetal en especial a la Licda. Margarita Palmieri, Leyda Hernández y Wilfredo López por el apoyo para realizar este estudio, desde la concepción de la idea hasta la colecta y procesamiento de muestras. A la Dra. Judith Brown por su ayuda para completar la investigación con el análisis de secuenciación y a la Dra. Pamela Pennington por su ayuda en interpretación de resultados.

Finalmente deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a mis padres, hermana y Estuardo Funes Solares por su apoyo incondicional y a todas aquellas personas que de una u otra forma fueron parte de éste logro.

## CONTENIDO

	Página
PREFACIO	vi
LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	x
ABSTRACT.....	xi
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN .....	1
A. Antecedentes .....	2
B. Objetivos.....	11
C. Hipótesis.....	11
II. MÉTODOS	
A. Metodología.....	12
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
A. Cuantificación de ADN.....	17
B. Optimización PCR.....	17
C. Incidencia de TYLCV en plantas con y sin síntomas.....	19
D. Relación incidencia vector-cultivo.....	21
E. Distribución TYLCV.....	23
F. Clonación y secuenciación.....	25
IV. CONCLUSIONES.....	30
V. RECOMENDACIONES.....	31
VI. LITERATURA CITADA.....	32
VII. ANEXOS.....	36

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Funciones principales para los genes de TYLCV.....	5
2. Secuencia de los cebadores utilizados para la detección de TYLCV.....	14
3. Mezcla de reacción de PCR para la detección de TYLCV.....	15
4. Programa de amplificación para la detección de TYLCV.....	15
5. Cuantificación de ADN y pureza de material vegetal.....	17
6. Riesgo relativo y riesgo atribuible a la presencia y ausencia de sintomatología.....	19
7. Intervalos de confianza para co-infección de begomovirus en plantas de tomate.....	20
8. Comparación de incidencia de TYLCV en plantas y el vector.....	21
9. Comparación de incidencia de TYLCV en las diferentes regiones de la República de Guatemala.....	24
10. Secuencia consenso de TYLCV en Guatemala.....	26
11. Fragmentos de amplificación utilizando los cebadores PTYIRv21 y PTYIRc287.....	36
12. Especificaciones de cebadores utilizados.....	37
13. Concentración de ADN y pureza para muestras de tejido vegetal.....	37
14. Clasificación por género y especie de mosca blanca.....	40
15. Plantaciones de tomate utilizadas como punto de muestreo.....	42
16. Número de acceso a base de datos en GenBank.....	44
17. Reactivos .....	45
18. Equipo .....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Organización genómica de TYLCV.....	4
2. Sintomatología ocasionada por TYLCV.....	8
3. Diferenciación de omatidios en <i>Bemisia tabaci</i> .....	13
4. Diferenciación de género en <i>Bemisia tabaci</i> .....	13
5. Optimización de temperatura de anidación para cebadores.....	18
6. Productos de PCR con amplificación selectiva para TYLCV.....	18
7. Incidencia de co infección de TYLCV y otros Begomovirus relacionados.....	20
8. Mapa de distribución de TYLCV en Guatemala.....	23
9. Digestión del plásmido pGEM T-easy con ECO RI.....	25
10. Amplificación de plásmido mediante cebadores M13.....	25
11. Dendrograma con secuencias alineadas de TYLCV con Máxima Parsimonia.....	28
12. Dendrograma con secuencias alineadas de TYLCV con Neighbor Joining.....	29
13. Box plot de la concentración de ADN para la determinación de la normalidad en los resultados.....	37
14. Poblaciones de mosca blanca en plantaciones de tomate.....	42
15. Secuencias con alineamientos significativos.....	45

## RESUMEN

El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV, por sus siglas en inglés) es el agente causal de una enfermedad extremadamente destructiva en cultivos de tomate. Es la más grave y afecta la producción y la calidad del fruto, lo cual es muy dañino para la economía agronómica del país. En muchos países, la falta de control de esta enfermedad ha ocasionado pérdidas de más del 80% de la producción nacional. El cultivo ha sido en el tiempo un rubro de impacto económico, social y ambiental. Los objetivos principales de este estudio fueron: la determinación de la incidencia y distribución del virus mediante pruebas moleculares en distintas plantaciones productoras de tomate a partir de hojas con y sin síntomas y del vector *Bemisia tabaci* en la República de Guatemala durante la época seca y optimización de las técnicas de detección, donde éstas pruebas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se analizó un total de 910 plantas de tomate y 151 *B. tabaci* con una incidencia de 2.4% (1.6 a 3.6) y 0.7% (0.1 a 3.7) respectivamente. También se determinó que las plantas con síntomas tienen 3 veces más riesgo de tener el virus que las plantas con ausencia de síntomas y que la técnica empleada es adecuada para la detección del virus incluso antes de presentar sintomatología. Se recomienda realizar un monitoreo del virus para comparar la incidencia a lo largo del tiempo, realizar estudios de transmisión del virus y coleccionar muestras de plantas de tomate en diferentes etapas de crecimiento y relacionar el porcentaje de incidencia con la producción del cultivo.

## ABSTRACT

The Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) is the causal agent of an extremely destructive disease in tomato cultivars that causes perhaps the most devastating epidemics in tomato agriculture. It affects the production and the quality of the fruit, which is very harmful for the economy of the country. In many countries, the lack of control of this disease has caused significant and often total yield losses. The primary objectives of this study were: 1) determination of the incidence and distribution of the virus in tomato cultivars and the whitefly vector *Bemisia tabaci* in the Republic of Guatemala during the dry time and 2) optimization of the detection techniques, where these tests are based on the chain reaction of the polymerase (PCR). 910 plants of tomato and 151 whiteflies were analyzed with a total incidence of 2,4% (1,6 to 3,6) and 0,7% (0,1 to 3,7) respectively. Results show that plants with symptoms have 3 times more risk of having the virus than the plants with absence of symptoms. Finally the technique used is customized for the detection of the virus even before presenting symptoms. It is recommended to realize a monitoring of the virus to compare the incidence throughout the time, to realize studies of transmission of the virus and to establish control measures.

# I. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es una planta de la familia de las solanáceas originaria de América Latina que se ha convertido en un cultivo con la capacidad de sobrevivir a diferentes condiciones ambientales. La fruta del tomate es rica en vitaminas y minerales. Recientemente se hace mucho énfasis en el cultivo de tomate no sólo como una fuente nutricional sino como una fuente de ingresos y seguridad alimentaria.

En Guatemala se producen más de 57,000 toneladas métricas de tomate al año, lo cual representa un importante rubro para la economía del país. Una característica que posee este cultivo, en términos de distribución de la producción, es que se cultiva en los 22 departamentos de Guatemala, sin embargo, el 82% se centra en ocho departamentos: Jutiapa, Baja Verapaz, Chiquimula, Guatemala, Zacapa, El Progreso, Alta Verapaz y Jalapa.

Durante el 2006 y 2007, la Universidad del Valle de Guatemala en colaboración con la Universidad de Davis California, Estados Unidos, encontró la presencia del begomovirus *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) en la zona de Salamá, Sanarate y Asunción Mita, Baja Verapaz, Guatemala.

En la actualidad se sabe sobre la presencia de begomovirus como una de las enfermedades más dañinas y más común en las plantaciones de tomate. Aunque sólo se conocen ocho begomovirus de tomate en Guatemala, el TYLCV es el más dañino, ya que tiene la capacidad de producir pérdidas en las plantaciones en un 100%. Es por ello que es necesario identificar la distribución e incidencia del virus, para poder desarrollar estrategias de control adecuadas para el manejo y control del TYLCV.

Mediante el desarrollo de este proyecto se determinó la incidencia y distribución del virus tanto en plantas de tomate y en el vector *B. tabaci*, además de optimizar las técnicas de diagnóstico en el laboratorio para su detección, esto con el fin de contribuir a fortalecer el programa nacional de control de plagas, obteniendo así, mayores ganancias económicas. Al realizar y/o implementar estrategias de control de virosis, se aumenta la productividad, en este caso del fruto, dando como resultado un mayor rendimiento en la cosecha y por consiguiente mayores beneficios económicos a los productores.

## A. Antecedentes

1. *Lycopersicon esculentum*: El tomate (*Lycopersicon esculentum*), es una planta de la familia de las solanáceas originaria de América Latina que se ha convertido en un cultivo con la capacidad de sobrevivir a diferentes condiciones ambientales. La fruta del tomate es rica en vitaminas y minerales. En la Actualidad se hace énfasis en el cultivo de tomate no sólo como una fuente nutricional sino como una fuente de ingresos y seguridad alimentaria (Mejía 2006).

La duración del ciclo del cultivo de tomate está determinada por las condiciones climáticas de la zona en la cual se establece el cultivo, el suelo, el manejo agronómico, el número de racimos que se van a dejar por planta y la variedad utilizada. El desarrollo del cultivo comprende dos fases: una vegetativa y otra reproductiva. La fase vegetativa se inicia desde la siembra en semillero, seguida de la germinación, la emergencia y el trasplante a campo, el cual se realiza con un promedio de tres a cuatro hojas verdaderas, entre 30 a 35 días después de la siembra y a partir del trasplante hasta el inicio o aparición del primer racimo floral. La fase reproductiva se inicia desde la formación del botón floral, que ocurre entre los 30 y los 35 días después del trasplante, el llenado del fruto, que dura aproximadamente 60 días para el primer racimo, iniciándose la cosecha a los 90 días, con una duración de tres meses para una cosecha de 8 a 10 racimos. En total la fase reproductiva tiene una duración de 180 días aproximadamente.

Guatemala es el principal productor de tomate de Centro América seguido de Costa Rica, Nicaragua y Honduras. En Guatemala se producen en promedio más de 57,000 toneladas métricas de tomate al año, lo cual representa un importante rubro para la economía del país. Una característica que posee este cultivo, en términos de distribución de la producción, es que se cultiva en los 22 departamentos de Guatemala, sin embargo, el 82% se centra en ocho departamentos: Jutiapa, Baja Verapaz, Chiquimula, Guatemala, Zacapa, El Progreso, Alta Verapaz y Jalapa. En el año 2008, la producción anual fue de 208,377 toneladas métricas. Sin embargo este cultivo es afectado por varios patógenos (hongos, bacterias y virus) que disminuyen su producción (MAGA 2008). Por lo que si se conociera el comportamiento de determinado patógeno, se pueden implementar medidas de control como: 1) utilizar pesticidas con moderación, sólo cuando se rebasan niveles mínimos de insectos dañinos (no hay que intentar aniquilar totalmente una "plaga", sino mantenerla en niveles asumibles) ya que los productos químicos matan no sólo a las plagas sino también a sus enemigos naturales, o sea los depredadores que destruyen las plagas dañinas a los cultivos, 2) utilizar variedades resistentes a ciertas enfermedades, 3) eliminar las partes infectadas de las matas de tomate y las malezas para reducir las fuentes de inóculos, 4) rotar cultivos: el cultivo de tomate se debe alternar con otros cultivos que no sean afectados por las mismas plagas e 5) inspeccionar constantemente de los campos para determinar regularmente el nivel de las plagas y de sus enemigos naturales, como base para recomendar los tratamientos.

2. *Begomovirus*: El género *Begomovirus* (*Geminiviridae*) es un grupo de virus en plantas que se caracterizan por tener un genoma circular de simple cadena de ADN, y sus miembros pueden ser monopartitos o bipartitos, están protegidos por la cápside en partículas gemelas, casi icosaédricas y son transmitidos obligadamente por el insecto vector, mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Lazarowitz 1992).

Los begomovirus son principalmente de dos partículas, pero los begomovirus del Viejo Mundo (Europa, Asia y África) son de una sola partícula. Los begomovirus de dos partículas tienen dos componentes designados como A y B. Cada componente tiene ~2,600 nt. Los genes del componente A están involucrados en la encapsidación y en la replicación, mientras que los genes del componente B están involucrados en el movimiento de los virus a través de la planta, en la determinación del rango de hospederos y en la expresión de síntomas (Gafni y Epel 2002).

En México los primeros reportes en enfermedades causadas por Geminivirus se obtuvieron de estudios realizados en los estados ubicados al norte del país, Sinaloa y Sonora, en cultivos de tomate, chile y frijol. A partir de los años 80 se han observado la misma sintomatología en diferentes estados y en Estados Unidos. Existen dos posibles explicaciones de la propagación de enfermedades virales ocasionadas por Geminivirus. La primera sugiere que la dispersión se lleva a cabo por la comercialización de cultivos de su lugar nativo a otras áreas agrícolas. El segundo escenario es que cada área de cultivo tiene un geminivirus endémico y hasta en la actualidad lo han detectado. La introducción del biotipo B en el vector, variaciones en condiciones ambientales que han favorecido el incremento de poblaciones de mosca blanca (resistencia a insecticidas, etc) y la falta de rotación en los cultivos a través de los años, son factores que posiblemente han tenido impacto en los dos casos mencionados (Brown 2000; Morales y Anderson 2001).

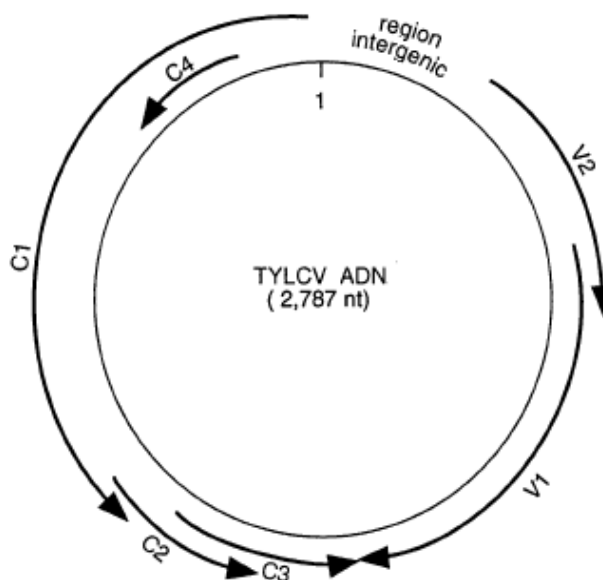
### 3. *Virus del rizado amarillo del tomate*

a. Generalidades: También denominado el virus de la cuchara y/o TYLCV por sus siglas en inglés (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*), pertenece al género de Begomovirus. El TYLCV es el virus más representativo del grupo de virus monopartitos de Begomovirus y se conoce como la principal causa de enfermedad en tomate en países del Medio Oriente. Los primeros reportes de infecciones con TYLCV en cultivos de tomate fueron en Israel y otros países del Medio Oriente desde 1930 y desde 1960 este virus ha emergido (Cohen & Antignus 1994).

El TYLCV fue reportado en el trópico, subtropical y en el Mediterráneo y se ha encontrado recientemente en áreas con climas templados (Czosnek, Navot y Laterrot 1990; Moriones y NavasCastillo 2000).

b. Genoma: El genoma del TYLCV codifica seis marcos abiertos de lectura parcialmente traslapados, organizados bidireccionalmente en dos unidades transcripcionales separadas por una región intergénica (IR) aproximadamente de 300 nucleótidos. Dos de ellos se encuentran en el sentido del virión (V1 y V2) y cuatro en sentido complementario al virión (C1, C2, C3 y C4) (Palanichelvam *et al* 1998).

Figura 1. Organización genómica del TYLCV. Las flechas indican todos los marcos abiertos de lectura en el genoma del TYLCV. El gen V1 codifica para la proteína de la cápside (CP) (Palanichelvam *et al* 1998).



Las proteínas que codifica son (Gafni y Epel 2002):

- La proteína de la cápside (CP): V1 ORF, su función está asociada a la encapsidación del genoma y es esencial para la propagación viral. La CP y Pre-CP ó V2 son esenciales para el movimiento local y sistémico, el cual se supone que transporta el genoma viral hacia y fuera del núcleo del hospedero. Las propiedades de V1 también incluyen la unión y protección de ADNsh viral. También es necesaria para la transmisión del vector.
- Proteína asociada a la replicación (Rep): C1 ORF es la única proteína conocida que está involucrada en la replicación viral.
- Proteína de activación transcripcional (TrAP): C2 ORF está involucrada en la activación de la transcripción a partir de un promotor de la proteína de la cápside. Se ha encontrado que está localizada en el núcleo y contribuye a la patogenicidad viral.
- Proteína promotora de replicación (REn): C3 ORF interactúa con la proteína C1 y promueve la acumulación de ADN viral.
- La C4 es importante en el desarrollo síntomas y está involucrada en la iniciación de la división celular.

El ADN A de las especies con genomas bipartitos está ordenado en una manera similar en los begomovirus monopartitos. Para el Nuevo Mundo, los begomovirus bipartitos, al ADN le falta el gen V2. El componente de ADN B codifica BV1 y BC1, proteínas asociadas al movimiento intercelular y sistémico y puede afectar en el rango de hospederos.

A continuación se presenta un resumen con las principales funciones de las proteínas codificadas por cada uno de los genes de TYLCV:

Cuadro 1. Funciones principales para los genes del TYLCV.

<i>Función</i>	<i>Gen involucrado</i>
Replicación	Rep (C1) Ren (C3)
Transcripción	
Activación tardía de genes	TrAP (C2)
Encapsidación e Insecto	CP (V1)
Transmisión	
Movimiento	MP (V2) CP (V1)
Sintomatología	C4
Regulación viral ADNsh	CP (V1)
Acumulación	MP (V2)

c. **Replicación:** La replicación de los begomovirus ocurre en el núcleo de las células infectadas. Antes de infectar las células de las plantas, el virus tiene que cruzar varias barreras como la pared celular y la membrana plasmática, y eventualmente el ADN debe ser capaz de entrar al núcleo. Esta interacción supone la interacción con el hospedero (elementos del citoesqueleto) y proteínas virales (Nakhla y Maxwell 1998).

Debido a que los geminivirus utilizan el método de replicación del círculo rodante, se forma un intermediario de ADNdh, el cual se convierte posteriormente en fragmentos de ADN circular. De una forma más precisa se puede decir que el ADNsh se convierte por las enzimas del hospedero en ADNdh, el cual sirve de templado para la transcripción de genes virales. Los intermediarios de ADNdh se transcriben en el núcleo de las células infectadas de la planta mediante el mecanismo del círculo rodante (Zhang, Gong y Zhou 2000).

Tanto la replicación como la transcripción ocurren en el núcleo, la introducción del ADN viral y/o viriones dentro y fuera de las células de la planta son esenciales para completar completamente el ciclo de vida. Sin embargo, un paso crucial en la infección con begomovirus, la unión del genoma viral involucrado en el poro nuclear, el mecanismo permanece desconocido (Gafni, 2003). Cuando se completa la replicación, la forma infectiva del virus se dispersa a células adyacentes vía el plasmodesmo (Gafni y Epel 2002).

Existen varias hipótesis que sugieren el origen y aparición de begomovirus monopartitos como el TYLCV. Análisis en las secuencias sugieren que los aislados de Israel e Irán con genomas quiméricos que surgieron por recombinación natural entre los ancestros TYLCD (tomato yellow leaf curl disease) y ToLCD (tomato leaf curl disease), ambos originarios de países del Medio Oriente (Moriones y NavasCastillo 2000).

d. **Introducción al Nuevo Mundo / Distribución:** El TYLCV fue identificado por primera vez en Israel en 1939, sin embargo fue hasta 1988 que se obtuvo su secuencia genómica. En los años ochenta el TYLCV estaba localizado en el Medio Oriente, en 1980 los primeros reportes de Europa provienen de Italia, seguidos por España en 1987 (Rubio 2002). A inicio de los noventa el TYLCV era denominado la “Enfermedad del Mediterráneo”. En 1990 se comienzan los reportes en Centro América, específicamente en Nicaragua y Honduras (Nakhla *et al* 1994). En el año 1995 se detectó en Suramérica (Polston y Anderson 1997). A finales de los noventa el TYLCV ya se había establecido en el hemisferio occidental. A inicio del 2000 la enfermedad se esparció al sureste de Asia y Australia. Entre 2002-2003 ocurrió el primer reporte de Geminivirus en Brasil y no fue hasta el año 2006 cuando se detectó por primera vez en Guatemala.

En China, el primer reporte de TYLCV fue en Shanghái en el año 2006. Luego fue detectado en otras ciudades. A partir de ese momento ocurrieron varios brotes en diferentes regiones de China, causando daños severos en la producción de tomate (Zhang *et al* 2009). El TYLCV también se ha detectado en el Caribe en países como México, Estados Unidos, Cuba y República Dominicana, Venezuela, Jordania, Egipto, Moroco e Irán (Zambrano *et al* 2007). En cada uno de estos lugares el virus se continúa distribuyendo, lo cual contribuye al desarrollo de infecciones mixtas en países o lugares cercanos.

Hace algunos años se creía que la introducción del TYLCV en el Nuevo Mundo (continente americano) pudo ser a través de República Dominicana a principio de los noventa a través de Cuba, posiblemente por un cargamento de pilones de tomate proveniente de Israel y como consecuencia el TYLCV se distribuyó al Caribe y Norteamérica. Esta hipótesis se sustenta en estudios previos sobre filogenia mostraban que la procedencia del TYLCV pertenecía a una sola línea filogenética, sin embargo, nuevos aislados provenientes de México, Sinaloa y California muestran que no están altamente relacionados, lo cual sugiere que éstas nuevas cepas descienden de una segunda introducción completamente independiente a la primera (Siobain y Holmes 2007).

La aparición y la rápida propagación de los Begomovirus como el TYLCV, en algunas ocasiones causan infecciones mixtas. Debido a que los insecticidas para controlar al vector resulta infectivo y es dañino al medio ambiente, la resistencia genética en el hospedero es crucial para el manejo y control de enfermedades.

e. Método de transmisión / Vector: El virus es transmitido obligadamente por un insecto vector, la mosca blanca de especie *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). Este vector permite la rápida y eficiente propagación del virus por su amplia e indiscriminada dieta de plantas. La transmisión es en forma persistente circulativa al alimentarse de los jugos del floema donde se encuentra localizado el virus de la planta enferma (Mehta *et al* 1994). En general no se transmite por inoculación mecánica y no ha sido demostrada la transmisión por semilla. Sin embargo se ha logrado transmitir mediante injerto.

Se conocen más de 1200 especies de mosca blanca en el mundo, sin embargo solo se estudia un número limitado. Las especies del género *Bemisia* son las más importantes y se cree que tuvieron origen en el sur este de Asia o posiblemente en África. *Bemisia tabaci* es la especie de *Bemisia* más distribuida y con mayor importancia económica. Su importancia ha crecido durante los últimos 30 años por ser una peste directa y vector de virus en plantas, principalmente geminivirus (familia *Geminiviridae*; genero *Begomovirus*) (Brown 2000).

*B. tabaci* puede causar daño en las plantas a través de la alimentación directa y con la inducción se síntomas fitotóxicos, este último solo se le atribuye a ciertos biotipos. La alta especificidad a la proteína de la cápside viral con receptores de la mosca blanca que interviene en la transmisión sugiere fuertemente que el virus y el vector han evolucionado con una cercana asociación (Brown y Czosnek 2001). La mosca blanca se alimenta del floema de las plantas y en el caso de del TYLCV del tomate parece que hay un tropismo en el tallo (Cohen y Antignus 1994).

Estudios sugieren que las hembras son más eficientes vectores de TYLCV (6:1) que los machos. Hasta 1998 se suponía que el TYLCV no era transmisible a la progenie, sólo adultos o las larvas pueden adquirir el virus. Sin embargo en 1998, se encontró que el TYLCV-Mld se transmite a los huevos al menos dos generaciones (Ghanim *et al* 1998). También se reportó que el TYLCV-Mld podría ser transmitido sexualmente entre mosca blanca, desde macho virulentos a hembras no virulentas y viceversa.

Sin embargo otro reporte proveniente de Israel con la cepa de TYLCV indica que ni el ADN viral ni la inefectividad están asociados con la progenie de hembras virulentas. En este reporte también indican que sólo el ADN de TYLCSV puede ser heredado transováricamente a la progenie, pero no la inefectividad (Cohen y Antignus 1994). Estos resultados parecen a simple vista ser confusos, lo cual sugiere que las cepas de TYLCV y los biotipos de mosca blanca pueden interactuar de muchas maneras diferentes.

f. **Sintomatología:** La manifestación de los síntomas varía de acuerdo con la edad, la susceptibilidad de la planta y con las condiciones ambientales del lugar. Las plantas jóvenes son más susceptibles que aquellas que están próximos a alcanzar su estado de madurez (Nakhla, Mazyad y Maxwell 1993). En tomate, los síntomas del TYLCV son más severos cuando la infección ocurre en edad temprana y varían dependiendo del cultivo. Cuando los pilones de tomate están infectados, las pérdidas en producción pueden llegar al 100%.

Los síntomas característicos en las hojas consisten en un enrollamiento hacia arriba (forma de cuchara), tamaño reducido, moteado y clorosis en los bordes. En cuanto a las flores ocurre abscisión dando como resultado una reducción en la producción de fruto. En cuanto a la planta en general se observa enanismo. Cuando la infección es temprana, las plantas presentan tamaño reducido, baja producción y calidad del fruto (Moshe 2001).

En muchas localidades, la incidencia del virus alcanza un 100% durante la época seca y las pérdidas en los cultivos alcanzan un 60%. Ésta epidemia está asociada a las prácticas agronómicas utilizadas incluyendo la falta de rotación entre cultivos o cultivos que funcionan como hospederos para el vector natural, *Bemisia tabaci*, así como la falta de remoción de malezas alledañas (Polston *et al* 1997).

Figura 2. Sintomatología ocasionada por TYLCV (Morales 2009)



g. **Rango de hospederos:** Pruebas en laboratorio mediante inoculación con vector virulento y muestreos en campos indican los potenciales hospederos para TYLCV incluyendo 13 especies de plantas agrupados en 6 familias (Cohen y Antignus 1994). Las plantas hospederas incluidas son: *Asclepiadaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Gentianaceae*, *Cleomaceae*, *Cucurbitaceae* y *Apiaceae* (Nakhla y Maxwell 1998).

Ejemplos de maleza hospedera y otros cultivos incluyen: *Datura stramonium*, *Hyoscyamus desertorum*, *L. esculentum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Phaseolus vulgaris*, *Capsicum annum*, *Capsicum chinense*, *Solanum nigrum*, *Mercurialis ambigua*, *Eustoma grandiflorum*, *Calopogonium spp.* Otras especies de plantas que mostraron ser susceptibles a TYLCV pero no presentan síntomas de la enfermedad son especies de malezas: *Cleome viscosa* (*Caparidaceae*) y *Croton lobatus* (*Euphorbiaceae*) (Salati *et al* 2002).

h. Recombinación genética: Las infecciones mixtas con dos o más geminivirus es común en las áreas tropicales y subtropicales (Sanz *et al* 2000).

Las interacciones con infecciones mixtas pueden jugar un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades complejas. El tipo de interacciones entre co-infección de virus pueden crear sinergismo provocando que los síntomas sean mucho más severos que los que se observan en virus individuales o interferir un virus puede afectar el ciclo viral de otro virus (Harrison y Robinson 1999). La posible interacción incluye eventos como complementación o recombinación (Sanz *et al* 2000).

Un ejemplo de interacción de virus dependiente del hospedero se encontró entre *Pepper huasteco virus* y *Pepper golden mosaic virus*, ambos geminivirus. El antagonismo se observó en cultivos de Chile, sin embargo se observó sinergismo en *Nicotiana benthamiana* (Pita *et al* 2001).

Otro ejemplo similar de sinergismo incluyendo recombinación se observó con *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) y TYLCV en España, el recombinante resultante pareciera ser mejor que los aislados originales (Gharsallah *et al* 2007).

La recombinación es considerada como un rol crucial en la evolución de los virus, especialmente en las poblaciones de geminivirus donde contribuyen en la diversificación genética (Sanz *et al* 2000). En begomovirus la recombinación es tan frecuente que puede ocurrir entre cepas, especies, géneros y incluso familias (Harrison 1985).

i. Métodos de detección: El desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular en años recientes ha suministrado un valioso enfoque para la detección temprana y precisa, así como para la cuantificación de patógenos de plantas. Dos técnicas de diagnóstico molecular, técnicas inmunológicas y ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han aplicado exitosamente para la detección de varios patógenos incluyendo virus, bacterias y hongos (Brown 2000 y Herrera 1999).

Las técnicas basadas en detección de ADN, incluyendo PCR (Reacción de la Cadena de la Polimerasa) y secuenciación, se han convertido en las técnicas estándares de detección, identificación y clasificación de Begomovirus. Aislados completos del genoma viral o del componente A en virus bipartitos son utilizados comúnmente para estudios de filogenia. Sin embargo el gen completo de la proteína de la cápside (~575 pb) es un marcador molecular muy informativo para la clasificación provisional de Begomovirus cuando la secuenciación es limitada (Brown 2000).

La amplificación por PCR es una técnica altamente sensible que permite la detección, tras el diseño adecuado de cebadores, de geminivirus en general, el virus en particular e incluso la diferenciación entre especies y las infecciones mixtas, mientras que la serología es un método limitado para la detección de geminivirus debido a que presentan varios epítopes (Navas-Castillo *et al* 1998).

4. Estudios de incidencia: Estudios teóricos y empíricos han llevado al estudio de plagas en patógenos de plantas. Sin embargo no se da mucha importancia al muestreo de la proporción de plantas (ó unidades de plantas) infectadas por algún patógeno. En la mayoría de los casos relacionados a plantas, la proporción de plantas infectadas o enfermas generalmente se conoce incidencia de enfermedad (Madden, Hughes y Munkvold 1996). Los muestreos para determinar incidencia dependen del contexto epidemiológico para el estudio de enfermedades en plantas. Por ejemplo cuando se desea evaluar la eficacia de un manejo integral de plagas aplicando insecticidas o monitorear la incidencia a través del tiempo (Madden, Hughes y Munkvold 1996).

Una buena definición operacional para la incidencia de enfermedad se considera el número de unidades de plantas visiblemente enfermas dividido el número total de unidades de plantas recolectadas. Sin embargo se debe hacer una clara diferencia entre incidencia de enfermedad e incidencia del patógeno, ésta última se refiere a la detección del virus en las unidades de plantas muestreadas (Madden, Hughes y Munkvold 1996). También es importante diferenciar el término de incidencia respecto a prevalencia, ya que éste último se refiere al comportamiento y/o desarrollo de una enfermedad en un organismo o población a lo largo del tiempo, mientras que la incidencia es un evento puntual. Existen diferentes patrones de muestreo en el campo utilizados para estimar la incidencia de la enfermedad. Algunos patrones incluyen muestreos en forma de V, X, W, diamante y el utilizado normalmente, línea diagonal, donde todos son muestreos representativos de determinado lugar (Forrest 1997).

## B. Objetivos

1. **Objetivo general:** Determinar la incidencia y distribución del begomovirus *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* mediante pruebas moleculares en distintas plantaciones productoras de tomate a partir de hojas con y sin síntomas en la República de Guatemala durante la época seca.

2. **Objetivos específicos:**

- a. Optimizar la técnica de extracción de ADN y amplificación por reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia del begomovirus *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* en hojas de tomate.
- b. Optimizar la técnica de amplificación de ADN por PCR para detectar la presencia del begomovirus *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* en el vector *Bemisia tabaci*.
- c. Comparar la incidencia y distribución del begomovirus *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* en las distintas plantaciones por las regiones centro, norte, sur, oriente y occidente de la República de Guatemala.
- d. Comparar la incidencia de TYLCV en el vector *Bemisia tabaci* con la incidencia de TYLCV en plantas de tomate utilizando la PCR.

## C. Hipótesis

1. El begomovirus *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* está distribuido en todas las regiones de la República de Guatemala.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Metodología

1. Descripción del área de estudio: El proyecto se planteó para una cobertura territorial que involucró cinco regiones norte (Petén, Quiché, Alta Verapaz, Baja Verapaz e Izabal), sur (Retalhuleu, Suchitepéquez, Escuintla y Santa Rosa), centro (Guatemala, Sacatepéquez y Chimaltenango), oriente (Jutiapa, Jalapa, Zacapa, Chiquimula y El Progreso) y occidente (San Marcos, Quetzaltenango, Huehuetenango, Totonicapán y Sololá) de la República de Guatemala.

2. Colecta: Las muestras de plantas de tomate fueron colectadas por personal capacitado del laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala.

La colecta de hojas de tomate con y sin síntomas (hojas con enrollamiento hacia arriba, enaciones, clorosis, mosaico y/o enanismo) por TYLCV se realizó en época seca, es decir en los meses de abril y mayo del 2009. Como criterios de inclusión para definir los lugares de muestreo se utilizó la ubicación geográfica de la finca, el estado fisiológico del cultivo (plantas en flor para plantas sin síntomas) y la disponibilidad de los agricultores para colaborar en el estudio. En cada plantación se seleccionó un total de veinte plantas (diez con síntomas y diez sin síntomas) distribuidas en los extremos y en el centro para tratar de cubrir la mayor área de plantación posible, siguiendo el método de muestreo en forma de X. También se recolectó mosca blanca mediante un aspirador. En total se colectaron 910 hojas de plantas de tomate (460 con síntomas y 450 sin síntomas) distribuidas en 48 plantaciones. Es importante mencionar que las infecciones en plantas ocasionadas por virus generalmente ocurren de manera sistémica, esto se refiere a que la unidad de muestreo generalmente es una hoja o alguna otra parte de la planta y se asume que el resultado obtenido refleja de una manera precisa el estado de la planta en general. Cuando el número de unidades de muestreo es grande, la proporción de unidades infectadas se acerca más al estado general de una plantación (Forrest 1997).

Las muestras de tejido vegetal fueron transportadas en bolsas plásticas con cierre hermético y debidamente rotuladas con la fecha y el punto de colecta. Todas las muestras de tejido vegetal se transportaron en frío al Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Se analizó sintomatología y se almacenaron en nitrógeno líquido previo a la extracción de ADN.

Las muestras de mosca blanca se recolectaron mediante un aspirador en estado adulto del envés de hojas de tomate y/o malezas aledañas, éstas fueron transportadas en frascos con etanol al 70% debidamente rotuladas donde luego se clasificaron por género y especie por personal capacitado según Palmieri *et al*,

utilizando como criterio principal para la diferenciación entre especies la forma de los omatidios en la cabeza (Figura 3). El género se determinó utilizando como indicador el segmento final del abdomen (Figura 4).

Figura 3. Diferenciación de omatidios de las especies de más comunes de mosca blanca (Palmieri *et al.* 1999)

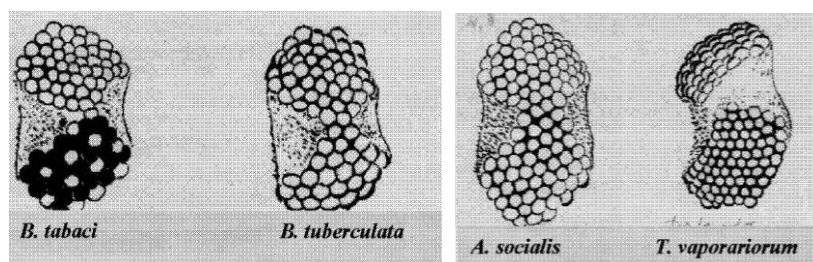
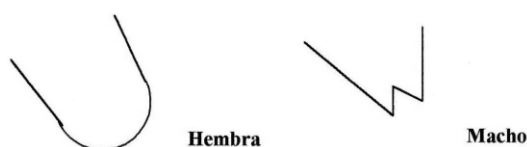


Figura 4. Segmento final del abdomen de mosca blanca para diferenciación de género (Palmieri *et al.* 1999)



3. Extracción de ADN tejido vegetal: El protocolo de extracción de ADN utilizado en plantas fue una modificación del protocolo propuesto por Zhang *et al.* (1998):

- a. Se colocaron entre 3-4 discos de hoja en un tubo de 1.5 mL (los discos se cortaron con la tapadera del tubo) (aproximadamente 0.01 g). De preferencia se seleccionaron hojas jóvenes.
- b. Se sumergió el tubo en N<sub>2</sub> líquido y se maceró con un palillo de madera nuevo para cada muestra.
- c. Se agregó 600 µL de buffer CTAB (Tris-HCl (100mM), EDTA (50mM pH8.0), NaCl (500mM, 2-mercaptoetanol (10mM)) a 65° y se incubó durante 15 min a 65°C agitando ocasionalmente.
- d. Se agregó 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó con vortex durante 2 min.
- e. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min.
- f. Se transfirió el sobrenadante a otro minitubo de 1.5 mL, evitando la interfase.
- g. Se agregó 60 µL de acetato de amonio y 400 µL de isopropanol.
- h. Se agitó invirtiendo el tubo varias veces y se incubó a 4° toda la noche.
- i. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min y se decantó el sobrenadante.
- j. Se lavó el pellet agregando 250 µL de etanol al 75%.
- k. Se decantó el sobrenadante y se secó el tubo manteniéndolo invertido y abierto sobre una servilleta durante 10 min.

1. Se calentó el buffer TE (Tris-EDTA) a 65°C y se resuspendió el ADN con 40 µL de buffer TE y se coloca en el horno a 65°C por 10 min, agitando el tubo ocasionalmente y se almacenó a 4°C.

4. Extracción de ADN de mosca blanca: Se tomó un máximo de 10 *Bemisia tabaci* hembras por plantación, con un total de 151 individuos. Se trabajó con moscas individuales, a cada una de ellas se le agregó 5µl de buffer de lisis (Proteinasa K 0.01%, Tris-HCl 5mM pH 8, EDTA 0.5mM pH 8, Nonidet P-40 0.5%) y se maceró con un pistilo plástico previamente desinfectado con cloro y agua destilada sobre una caja petri forrada con papel aluminio y parafilm, hasta obtener una consistencia uniforme. A la muestra se le agregó otros 40µl de solución amortiguadora de lisis y se calentó por 15 minutos a 70°C se almacenó a 4°C previo a la PCR.

5. Cuantificación de ADN y pureza: Se seleccionó un total de 130 muestras de ADN de material vegetal de manera aleatoria para la cuantificación y determinación de la pureza de ADN. En una celda de cuarzo se agregó buffer TE para medir el blanco. Cada lectura se realizó en un espectrofotómetro UV-Visible (Thermospectronic, Genesys 10) a una absorbancia de 260, 280 y 320nm, utilizando un factor de dilución de 100.

La concentración de ADN se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración ADN } (\mu\text{g/mL}) = (A_{260} - A_{320}) \times (\text{Factor de dilución}) \times (\text{Factor de corrección})$$

Donde el factor de corrección para ADN es de: 50 µg/mL.

La pureza de ADN se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Pureza} = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$$

6. Detección del virus mediante la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR): La detección de TYLCV por PCR se llevó a cabo mediante una modificación de las condiciones que describió Nakhla *et al.* (1993). Los cebadores a utilizados fueron: PTYIRv21 y PTYIRc287 como se describen a continuación:

Cuadro 2. Cebadores utilizados para la detección de TYLCV.

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia 5' → 3'</i>	<i>Posición* esperada</i>	<i>Tamaño (nt)</i>	<i>Referencia</i>
PTYIRv21	TTGAAATGAATCGGTGTCCC	2607–2635		Nakhla <i>et al.</i> (1993)
PTYIRc287	TTGCAAGACAAAAAACTTGGGACC	147–123	~311	

\*Ver Anexos (Cuadro 10. Fragmento de amplificación)

Como control positivo se utilizó ADN de tejido vegetal de hojas de tomate positivo para TYLCV previamente confirmado mediante secuenciación. La visualización se realizó con un transiluminador UV utilizando geles de agarosa al 1.5% con una migración a 85 voltios, 500mA durante 40 minutos y teñidos con bromuro de etidio.

A continuación se presentan las condiciones utilizadas para la detección de TYLCV:

Cuadro 3. Mezcla de reacción para detección de TYLCV por PCR para tejido vegetal y mosca blanca.

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración stock</i>	<i>Concentración Final</i>	<i>Volumen de stock para moscas blanca</i>	<i>Volumen de stock para plantas</i>
Agua doble destilada	--		7.75 µl	12.75 µl
Buffer para Taq	5X	1X	5 µl	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2.5 mM	2.5 µl	2.5 µl
dNTP's	2.5mM	0.15mM	1.5 µl	1.5 µl
Cebador PTYIRv21	6.25 µM	0.25 µM	1 µl	1 µl
Cebador PTYIRc287	6.25 µM	0.25 µM	1 µl	1 µl
Taq ADN polimerasa	5U/µl	0.05U/µl	0.25 µl	0.25 µl
ADN			5 µl	1 µl
<b>Total</b>			25 µl	25 µl

Cuadro 4. Programa de amplificación para detección de TYLCV por PCR

<i>Paso</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
1	2 minutos	94°C
2	1 minuto	94°C
3	1 minuto	60°C
4	1 minutos	72°C
5	Realizar 30 ciclos del paso 2 al 4	-
6	5 minutos	72°C
7	indefinido	4°C

7. **Clonación y secuenciación de la región intergénica de TYLCV:** Para confirmar la identidad de los fragmentos amplificados, los productos de PCR positivos para TYLCV fueron clonados en el vector pGEM-T easy (Promega Co., Madison, EU) siguiendo las especificaciones del fabricante y transformados mediante shock térmico en células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . La presencia del inserto fue confirmado mediante una digestión con enzimas de restricción, ECO RI. Se realizó un PCR utilizando primers universales M13 (forward y reverse) con los plásmidos con el inserto esperado. El producto de PCR fue secuenciado en un secuenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems, CA) del Centro de Análisis Tecnológico Genómico de la Universidad de Arizona.

Las secuencias fueron analizadas utilizando los programas EditSeq y SeqMan (DNASTar Inc., Madison, WI, EU) para obtener la secuencia consenso. Las secuencias se analizaron en BLAST utilizando la base de datos NCBI-GenBank para la identificación de parientes cercanos para ser incluidos en los alineamientos Clustal . Las secuencias se alinearon con Clustal W y el porcentaje de identidad (distancia) se calculó utilizando Máxima Parsimonia y Neighbor Joining con el programa Mega4 y un bootstap de 1000 repeticiones.

8. **Análisis estadístico:** Se utilizó estadística descriptiva para el cálculo de la media y desviación estándar de la concentración de ADN y pureza de las muestras escogidas al azar. Debido a que los valores de incidencia son proporciones, se utilizó una comparación de proporciones con 2 y múltiples variables para determinar correlación entre valores utilizando la prueba de hipótesis basada en una distribución distribución  $\chi^2$  (chi-cuadrado) sin corrección de continuidad. Para determinar el riesgo relativo asociado a la presencia ó ausencia de síntomas se utilizó el método de Newcombe, finalmente para los intervalos de confianza para proporciones se utilizó la corrección de Wilson. Los datos fueron analizados con el software “Confidence Interval Analysis (CIA) Software”, versión 2.2.0.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### A. Cuantificación ADN

La cuantificación de ADN y pureza se determinó con el fin de evaluar la calidad del material genético, se tomó un total de 130 muestras debido a que la metodología de extracción fue la misma para el total de las muestras. A continuación se muestra el resumen de los datos obtenidos:

Cuadro 5. Cuantificación de ADN y pureza de muestras de material vegetal.

	<i>Media</i> ( <i>n=130</i> )	<i>Desviación</i> <i>estándar</i>	<i>Intervalo de confianza*</i>
Concentración ADN ( $\mu\text{g/mL}$ )	281	219.07	242.947 a 318.98
Pureza	1.905	0.2364	1.864 a 1.946

\* 95% de confianza

Se puede observar que la concentración de ADN se encuentra en un intervalo de confianza entre 242.947 a 318.98, lo cual significa que existe un 95% de probabilidad que el rango propuesto incluya a toda la población, es decir a todas las muestras de ADN y con base a lo anterior se concentración de ADN es adecuada para la técnica de PCR.

En el caso de la pureza la asociación es similar y partiendo que el rango de pureza aceptado de ADN según Sambrook *et al* (1894) es de 1.8-2.0, las muestras cumplen con este requerimiento. En el caso que el ADN tenga una pureza menor a 1.7 sugiere contaminación con proteínas, si es mayor a 2.1 sugiere contaminación por cloroformo y en el caso que la pureza fuese menor a 1.6 es necesaria una re purificación.

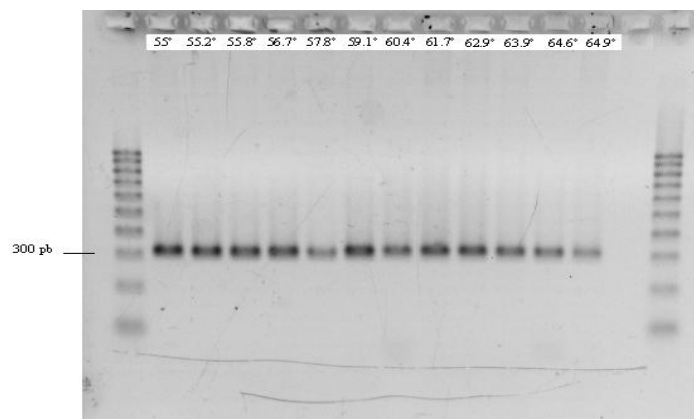
En el Cuadro 13 en la sección de Anexos se encuentran los resultados individuales para cada una de las muestras analizadas. En la figura 13 se encuentra un box plot que demuestra el comportamiento normal, es decir simétrico en los resultados de la cuantificación de ADN.

#### B. Optimización PCR para la detección de TYLCV

Para la optimización de la técnica de PCR para la detección de TYLCV se partió de las condiciones en cuanto a concentración y volumen de reacción utilizadas en el Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala, por lo que la optimización consistió en variaciones en la temperatura, para establecer la temperatura de anidación (tm) adecuada donde sea lo suficiente restringente sin afectar la adecuada amplificación.

A continuación se muestra una reacción de PCR con un gradiente de temperatura de 55-65°C partiendo que la temperatura de anidación para el cebador PTYIRv21 (Sigma) es de 64.6°C y para PTYIRc287 (Sigma) es de 68.6°C, donde generalmente se trabaja a 5°C debajo de la temperatura más baja (Ver especificaciones de cebadores en el Cuadro 12 en la sección de Anexos).

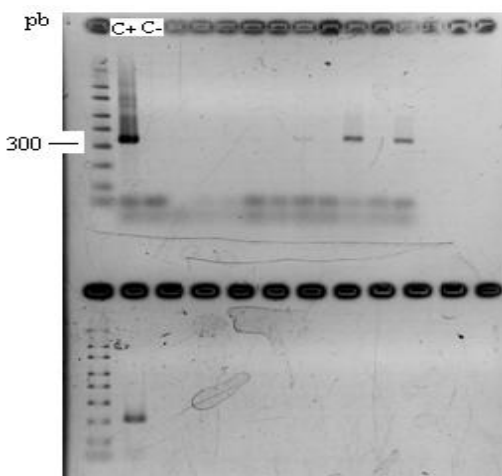
Figura 5. Optimización de temperatura de anidación para la detección de TYLCV mediante PCR. Marcador molecular 500-2,000 pb (Invitrogen)



Con base a lo anterior, la temperatura óptima fue de 60°C, ya que es la banda mejor definida y a la vez intensa. A menor temperatura se observa una banda más gruesa y difusa. A mayor temperatura la banda está mejor definida, sin embargo la intensidad es mejor.

De acuerdo a lo anterior se completó el análisis de las muestras. A continuación se muestra un gel de agarosa al 1.5% con el control positivo optimizado y muestras positivas:

Figura 6. Productos de PCR con amplificación selectiva para TYLCV en hojas de tomate en gel de agarosa al 1.5%. C+: control positivo, C-: control negativo. Marcador molecular 500-2,000 pb (Invitrogen)



Se puede observar que las bandas obtenidas superan las 300 pb, lo cual coincide con el tamaño esperado (~311 pb) por los cebadores utilizados. Es importante mencionar que no se conoce el nivel de detección del virus, por lo que el resultado depende de la carga viral presente en la planta.

### C. Estudio epidemiológico: Incidencia de TYLCV en plantas con presencia y ausencia de sintomatología.

Cuadro 6. Riesgo relativo y riesgo atribuible a la presencia y ausencia de sintomatología

	<i>Resultado (%)</i>	<i>Intervalo de confianza*</i>
Riesgo relativo	3.326	1.238 a 8.939
Riesgo atribuible	0.540	0.107 a 0.801

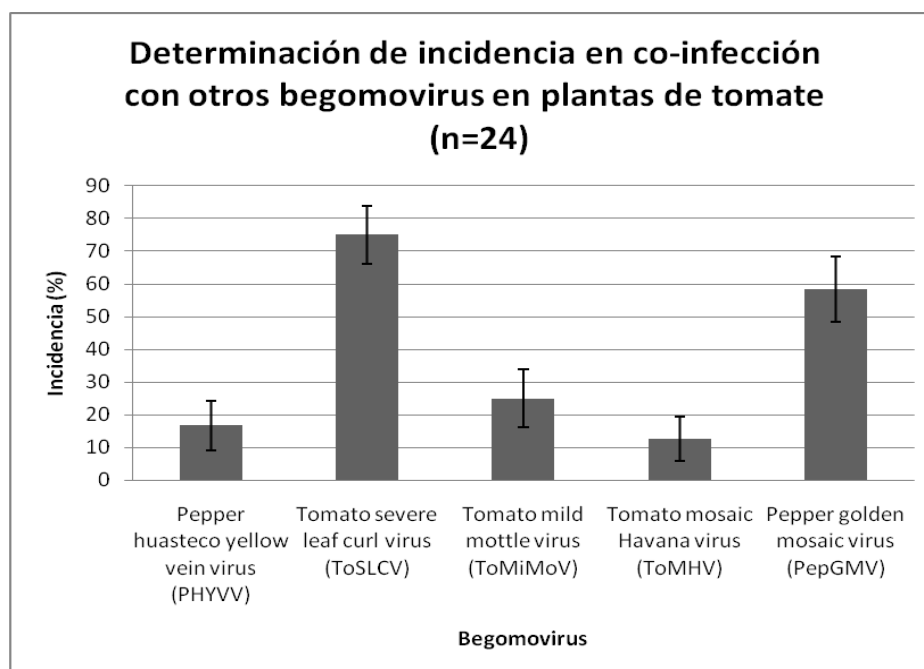
\* 95% de confianza

El riesgo relativo de que una planta sea positiva para TYLCV con la presencia de sintomatología es del 3.326, lo que significa que existe tres veces más probabilidad que las plantas con sintomatología tengan el virus. A pesar que el riesgo de tener la infección es mayor con la presencia de sintomatología no significa que no se pueda detectar del virus en plantas que no presenten sintomatología. Esto se determinó debido a que el virus se detectó en algunas plantas asintomáticas, y a pesar que las bandas fueron un poco débiles, se mostró que la técnica de PCR es eficaz para el diagnóstico precoz del virus, es decir, antes que los síntomas se manifiesten.

Es importante mencionar que la sintomatología puede estar ocasionada por una infección individual y en mezcla con otros virus, debido a ello, se determinó la posible co infección con otros begomovirus que se han encontrado que afectan el cultivo de tomate. Los resultados enseñan que todas las muestras positivas para TYLCV tienen co infección con al menos otro begomovirus, en algunos casos se observó la presencia de todos los virus.

Estudios muestran que se han observado a partir de 1999, plantas con síntomas de “acoloramiento”, provenientes de Sanarate, Guatemala. En ellas se identificaron tres especies de begomovirus, *Tomato severe leaf curl virus-Guatemala* (ToSLCV), *Tomato mottle virus-Guatemala* (ToMoV) y *Pepper golden mosaic virus-Guatemala* (PepGMV) (Mejía 1999), siendo éstos tres los que tienen la mayor incidencia de co infección con las plantas positivas para TYLCV.

Figura 7. Incidencia de co infección de TYLCV y otros Begomovirus relacionados



Se puede observar que el *Tomato Severe Leaf Curl Virus* está presente en el 75% de los casos positivos para TYLCV, por lo que la detección molecular debe ser un factor determinante para confirmar la presencia del virus.

A continuación se presentan los intervalos de confianza a un 95% para la co-infección con otros begomovirus.

Cuadro 7. Intervalos de confianza para co-infección de begomovirus en plantas de tomate.

<i>Virus (n=24)</i>	<i>Incidencia (%)</i>	<i>Intervalo de confianza (%)*</i>	<i>Error estándar de proporciones (%)</i>
PHYVV	17	6.7 a 35.9	7.6
ToSLCV	75	55.1 a 88	8.8
ToMiMoV	25	12 a 44.9	8.8
ToMHV	13	4 a 31	6.8
PepGMV	58	38.8 a 75.5	10

\* 95% de confianza

Bajo condiciones de campo, las infecciones virales mixtas son absolutamente comunes. Pueden resultar en una adición, sinergismo, o efectos mutuamente excluyentes en lo que respecta a los síntomas, además de proporcionar la posibilidad para desarrollar virus más patogénicos por recombinación genética.

En este contexto, el estudio de caso de TYLCV tiene importancia. El TYLCV se ha extendido por continentes, a las islas caribeñas, México y Estados Unidos durante los diez últimos años, fundando nuevas poblaciones. La coinfección de diversas especies del virus de TYLCV se han ampliado; un nuevo aislante del virus se ha desarrollado en el campo por la recombinación entre la ADN de Tomato yellow leaf curl Sardina virus (TYLCSV) y la cepa poco severa de TYLCV, antes conocida como TYLCV-Is, originaria en Israel, exhibiendo nuevas características biológicas con respecto a gama del anfitrión y a fenotipo de síntomas. Por lo tanto, la recombinación entre geminivirus podría ser un acontecimiento frecuente, capaz de proporcionar los nuevos virus que pueden ser dañinos bajo nuevas condiciones, por ejemplo, introducción de un nuevo anfitrión, el tipo de cultivo o un insecto del vector (Morilla *et al* 2004).

Los eventos de recombinación han sido frecuentes en genomas de begomovirus que afectan tomate tanto en el Viejo Mundo como en el Nuevo Mundo (Navas-Castillo *et al* 2000). También entre las mismas especies de TYLCV que presentan genotipos diferentes del origen de recombinación.

El control de la enfermedad ocasionada por el TYLCV depende de las prácticas de manejo de cultivos y en el desarrollo de cultivos de tomate resistentes a TYLCV (Moriones y Navas-Castillo 2000), por lo que la identificación de los virus es fundamental para su control y es necesario tener la secuencia del genoma completo para obtener de una manera certera la identificación del virus.

## D. Relación incidencia entre plantas y vector

La epidemia ocasionada por el TYLCV tiende a estar asociada a las altas poblaciones del vector, mosca blanca. Se ha observado que el virus infecta el tomate principalmente en verano y otoño, ocasionando pérdidas en las cosechas de un 100%.

En muchas áreas productoras de tomate, el TYLCV se ha convertido en un factor limitante en la producción, tanto en el campo como en invernaderos. A continuación se presenta la comparación de la incidencia en el cultivo y el vector:

Cuadro 8. Comparación de incidencia de TYLCV en plantas de tomate y el vector *B. tabaci* hembras.

$H_0$ : No existe diferencia significativa entre las dos incidencias

$H_a$ : Existe una diferencia significativa entre las dos incidencias

	<i>Incidencia (%)</i>	<i>Intervalo de confianza (%)*</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Intervalo de confianza</i>	$\chi^2$ **	<i>p</i> ***	<i>Conclusión</i>
Incidencia en plantas de tomate (n=910)	2.4	1.6 a 3.6					
Incidencia en vector (n=151)	0.7	0.1 a 3.7	1.8	-1.3 a 3.1	1.882	0.170	Se acepta H <sub>0</sub>

\* 95% de confianza

\*\*  $\chi^2$  tiene 1 grado de libertad debido a que se compararon dos proporciones.

\*\*\* Si  $p \leq 0.05$ , se rechaza H<sub>0</sub>

La diferencia entre la incidencia de TYLCV en plantas y la incidencia de TYLCV en el vector *B. tabaci* fue de 1.8%, con un intervalo total de 95% de confianza de -1.3 a 3.1%; la prueba  $X^2$  fue de 1.882 con 4 grados de libertad y asociado a un valor de p de 0.170, por lo que se acepta la hipótesis nula que indica que no existe diferencia significativa entre las variables, lo cual indica que no hay diferencia significativa entre la incidencia del vector y las plantas de tomate.

*B. tabaci* puede causar daño en las plantas a través de la alimentación directa y con la inducción se síntomas fitotoxícos, este último solo se le atribuye a ciertos biotipos. La alta especificidad a la proteína de la cápside viral con receptores de la mosca blanca que interviene en la transmisión sugiere fuertemente que el virus y el vector han evolucionado con una cercana asociación (Brown y Czosnek, 2001).

En el Cuadro 14 se encuentra la clasificación de mosca blanca por género y especie en cada una de las plantaciones muestreadas, es importante mencionar que sólo se tomó al género femenino de *B. tabaci* para la detección del virus. Estudios muestran que existen factores que permiten que el TYLCV permanezca en el vector: 1) el virus de TYLCV permanece en el insecto durante toda su vida, 2) el virus de TYLCV reduce significativamente el tiempo de vida del insecto y 3) el virus tiene un efecto negativo en la fecundidad del insecto (Rubinstein y Czosnek 1997).

Lo anterior puede ser una explicación de una incidencia baja en el vector, ya que al momento de la colecta se tomaron sólo las moscas blancas con vida, sin embargo vectores muertos pudieron haber transmitido el virus antes de morir.

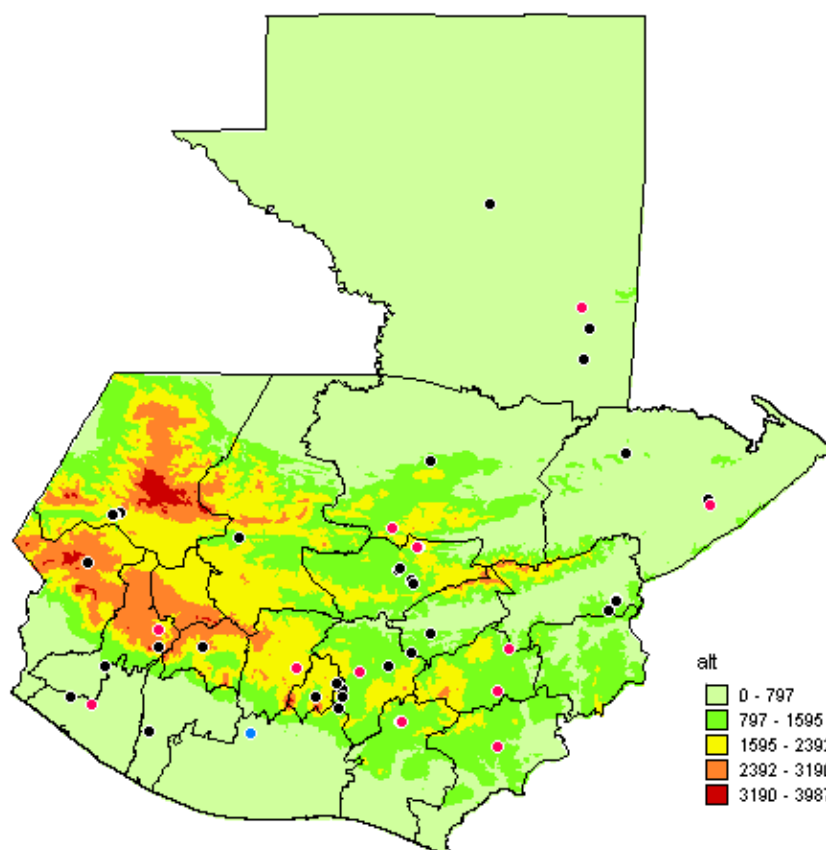
En el caso de la mosca blanca, *Trialeurodes vaporarorium*, aunque es capaz de adquirir el virus, no tiene la capacidad de transmitirlo, por lo que no fue considerado para el estudio.

## E. Distribución TYLCV en las diferentes regiones de la República de Guatemala

Se colectó un total de 910 de plantas de tomate en 48 plantaciones distribuidas en la República de Guatemala (ver Cuadro 15 en sección de Anexos con listado de plantaciones).

A continuación se muestra un mapa con los puntos de muestreo y distribución de TYLCV utilizando el programa DivaGis:

Figura 8. Mapa de distribución de casos positivos con TYLCV en las plantaciones muestreadas. Cada punto representa el lugar de muestreo, 48 en total. Los puntos rosados indican lugares de muestreo con plantas de tomate positivas para TYLCV y negativas para el vector. El punto azul representa la plantación con plantas de tomate y *B. tabaci* positiva. No sé encontró ningún lugar con el vector positivo y plantas negativas. Alt corresponde a la altura, es decir metros sobre el nivel del mar.



Se puede observar que el virus se encuentra distribuido en las diferentes regiones de la República de Guatemala.

A continuación se muestra el análisis estadístico para la incidencia encontrada en cada una de las regiones:

Cuadro 9. Comparación de incidencia de TYLCV en plantas de tomate y las diferentes regiones de la República de Guatemala.

H<sub>0</sub>: No existe diferencia significativa entre regiones

H<sub>a</sub>: Existe una diferencia significativa entre regiones

<i>Región</i>	<i>Incidencia (%)</i>	<i>Intervalo de confianza (%)</i> *	$\chi^2$ **	<i>p</i> ***	<i>Conclusión</i>
Norte (n=290)	2.1	1.0 a 4.4			
Sur (n=90)	2.2	0.6 a 7.7			
Oriente (n=220)	3.2	1.5 a 6.4	1.882	0.170	Se acepta H <sub>0</sub>
Occidente (n=180)	0.6	0.1 a 3.1			
Centro (n=130)	4.6	2.1 a 9.7			

\* 95% de confianza

\*\*  $\chi^2$  tiene 4 grados de libertad debido a que se compararon cinco proporciones.

\*\*\* Si  $p \leq 0.05$ , se rechaza H<sub>0</sub>

Se puede observar que al hacer una comparación múltiple de proporciones el estadístico chi cuadrado fue de 1.882 con un 95% de confianza, lo cual indica que no existe diferencia significativa entre regiones, es decir que la incidencia encontrada en las distintas regiones de la República de Guatemala es homogénea.

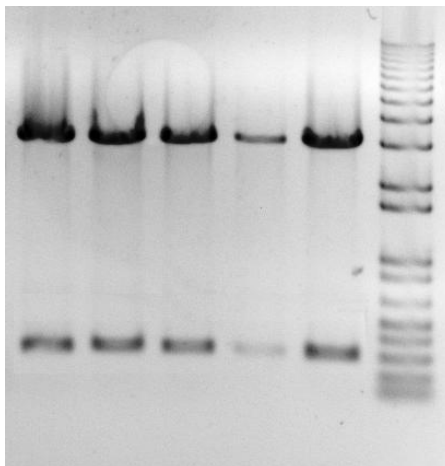
A pesar que las incidencias son relativamente bajas, los resultados son sumamente importantes, debido a que el virus es relativamente nuevo en Guatemala y en otros países a partir del momento que apareció se dispersó por diferentes regiones alcanzando pérdidas masivas e una incidencia del virus de un 60%, llegando a sustituir a otros virus presentes en la región. Reportes en pérdidas económicas muestran un 35% de pérdida de cosecha anual en Egipto, en Nicaragua se observó un 50% de destrucción, un 100% en Honduras, 25% en España, 80% en Italia y un 40% en Sinaloa, México. Se ha observado que la incidencia de la enfermedad ocasionada por TYLCV incrementa rápidamente, esto puede ser comprobado con la dispersión que ha tenido el virus en los últimos 10 años. En muchas regiones, nuevas cepas coexisten con cepas locales, pero en muchos casos los reemplaza como ocurrió en el sur de España (Czosnek 2008). Esto es de suma importancia ya que por ser un virus nuevo, si mantiene la tendencia como en otros países, en poco tiempo la incidencia puede ser considerable.

## F. Clonación y secuenciación

Los productos de PCR se clonaron en un vector para poder confirmar la presencia del virus. Para la selección de clones se realizó un screening el cual consistió en el uso de enzimas de restricción *Eco RI* para confirmar la presencia del inserto, a continuación se presenta un gel de agarosa al 1% con la digestión:

Figura 9. Digestión del plásmido pGEM T- easy clonado con inserto de TYLCV. Gel de agarosa al 1% .

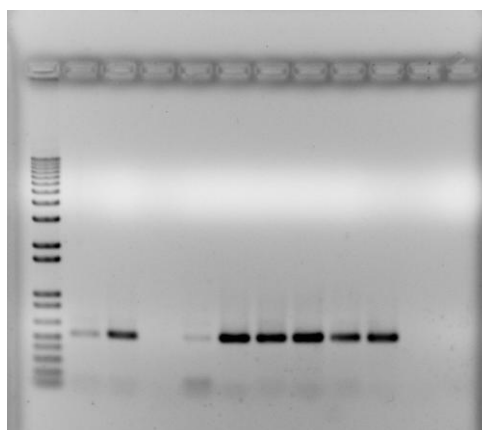
Marcador molecular: 1kb. Masa molecular del vector: 3015 pb



Se puede observar que la clonación fue exitosa debido a la presencia de la doble banda en el gel, lo cual indica que la banda con mayor masa molecular representa al plásmido y las bandas en la parte inferior corresponden al inserto de TYLCV.

De los clones con la presencia de inserto, se seleccionaron diez para realizar un PCR con cebadores específicos (M13), de los cuales tres se seleccionaron para secuenciación. A continuación se presenta el gel con la amplificación de PCR.

Figura 10. Amplificación de plásmido mediante cebadores M13. Marcador molecular: 1kb



Se puede observar que de diez plásmidos seleccionados, nueve amplificaron adecuadamente con los primers M13. Sin embargo solo se tomó el producto de PCR de tres de las muestras con las bandas de mayor intensidad para la secuenciación. Es importante mencionar que la clonación es un procedimiento adecuado para confirmar una determinada secuencia, ya que de esta manera el investigador puede estar 100% seguro que el resultado de secuenciación no está contaminado con algún posible sub producto del PCR.

Debido a que las secuencias obtenidas se enviaron en ambos sentidos, se elaboró una secuencia consenso, la cual fue igual para las tres muestras analizadas. En el siguiente cuadro se encuentra la secuencia consenso de la región intergénica que está circulando en Guatemala.

Cuadro 10. Secuencia consenso de TYLCV en Guatemala en cultivos de tomate, año 2009.

---

5'-TTTGAAATGAATCGGTGTCCCTTAAAGCTCTATGGCAATCGGTGTATCGGTGTCTTACTTATAC  
 CTGGATACCTAATGGCTATTTGGTAATTCATAAATGTTTCATTGCAATTCAAAATTCAAAATTCAA  
 AAATCAATTCATTAAGCGGTCATCCGTATAATATTACCGGATGGCCGCGCCTTTTCCTTTTATGT  
 GGCCCCACGAGGGTTACGCAGACGTCACTGTCAACCAATCAAATTGCATCCTCAAACGTTAGAT  
 AAGTGTTCAATTTGTCTTTATATACTTGGTCCCAAGTTTTTTGTCTTGCAA-3`

---

La región amplificada corresponde a un tamaño de 311 pb incluyendo los cebadores, los cuales están subrayados, sin embargo debido a que los cebadores corresponden a una secuencia exógena al genoma se eliminaron al momento de compararlos con las secuencias previamente reportadas, con un tamaño de 266 bp.

En la Figura 15 de anexos se encuentra los resultados de Blast para confirmar la presencia del virus. La comparación de secuencias muestran que el fragmento de PCR de dos muestras de tomate provenientes de Purulhá, Alta Verapaz y una de Amatitlán, Guatemala, presentan un 98% de identidad de nucleótidos de cuatro aislado de TYLCV proveniente de México, Jamaica, Cuba y Estados Unidos (Florida) (números de acceso AF168709.1, U84147.1, AF414089.1 y AF260331.1) y un 97% y 96% de identidad con diferentes aislados provenientes de diversos orígenes geográficos.

Debido a que el porcentaje supera el 70% no es considerada una nueva especie. Finalmente para explicar el ingreso del TYLCV a Guatemala se elaboró un árbol filogenético con el método de máxima parsimonia y neighbor joining para 30 secuencias similares a la obtenida en el estudio, incluyendo una secuencia utilizando los mismos cebadores en el año 2006 (Solares 2007) y una secuencia del genoma completo de TYLCV en Guatemala reportada por Gilbertson, 2009 en una muestra proveniente de Salamá, Baja Verapaz.

Un método rápido de diferenciar geminivirus es por la comparación de bases en una secuencia y mediante filogenia (Padidam *et al* 1995; Brown 1997; Fauquet *et al* 2003).

Sin embargo, existen diferentes opiniones al respecto. Algunos científicos consideran que la comparación puede realizarse con base a la región integénica o con el gen involucrado en la proteína de la cápside (Brown 1997) cuando no se cuenta con la secuencia completa de ADN, otros autores consideran que la comparación de secuencias completas es indispensable (Fauquet *et al* 2003).

Utilizando la región intergénica (Brown, 1997) fue posible generar una comparación de la identidad del TYLCV encontrado en este estudio. Los resultados muestran una secuencia de 266 nt.

El método de máxima parsimonia debido a que éste método considera y agrupa las especies relacionadas por similitud genética. Como grupo externo se consideró a un begomovirus monopartito, al igual que el TYLCV. Se observa que la secuencia TYLCV-GUA-2009 (Puruhlá), la cual fue ingresada a la base de datos de GenBank el 15/05/2010 con el número de acceso HM230692 está relacionada con las secuencias encontradas en el Caribe y México donde el valor de bootstrap es de 99%, mientras que la secuencia del genoma completa de TYLCV en Guatemala está agrupada separada de las dos secuencias de TYLCV aisladas en Guatemala. La secuencia

El método del vecino más cercano (Neighbor Joining-NJ) fue desarrollado por Saitou & Nei (1987) y es ampliamente utilizado. Se le ha considerado como un método de agrupamiento de bajo costo computacional, que produce aproximaciones satisfactoriamente buenas. El algoritmo NJ toma el valor mínimo de la matriz de distancias evolutivas modificadas por un término adicional llamado vector de divergencias.

Aunque no se pueden comparar los dos métodos de agrupación debido a que utilizan algoritmos diferentes se pudo observar que al utilizar el método de Neighbor Joining la secuencia encontrada en este estudio con la secuencia encontrada en el año 2006 están en el mismo clado y que la división de un nodo corresponde a un 99% de bootstrap con secuencias provenientes de Italia.

Los resultados sugieren que el ingreso de TYLCV a Guatemala ocurrió por México, sin embargo se desconocen las secuencias de otros países de Centro América para dar una mejor explicación de la introducción del virus al país.

Figura 11. Análisis de máxima parsimonia de la secuencia de la región intergénica mostrando una predicción de la relación entre TYLCV encontrado en Guatemala en el año 2009 vs 2006 utilizando el software MEGA 4.1. El aislado encontrado en este estudio fue denominado TYLCV-GUA-2009 Puruhlá (número de acceso HM230692). Los números representan el porcentaje de bootstrap que respalda cada nodo (1,000 réplicas). Sólo los valores con un bootstrap mayor que el 70% son mostrados. Para las abreviaciones de los nombres de los virus y el número de acceso, ver Cuadro 15 en sección de Anexos.

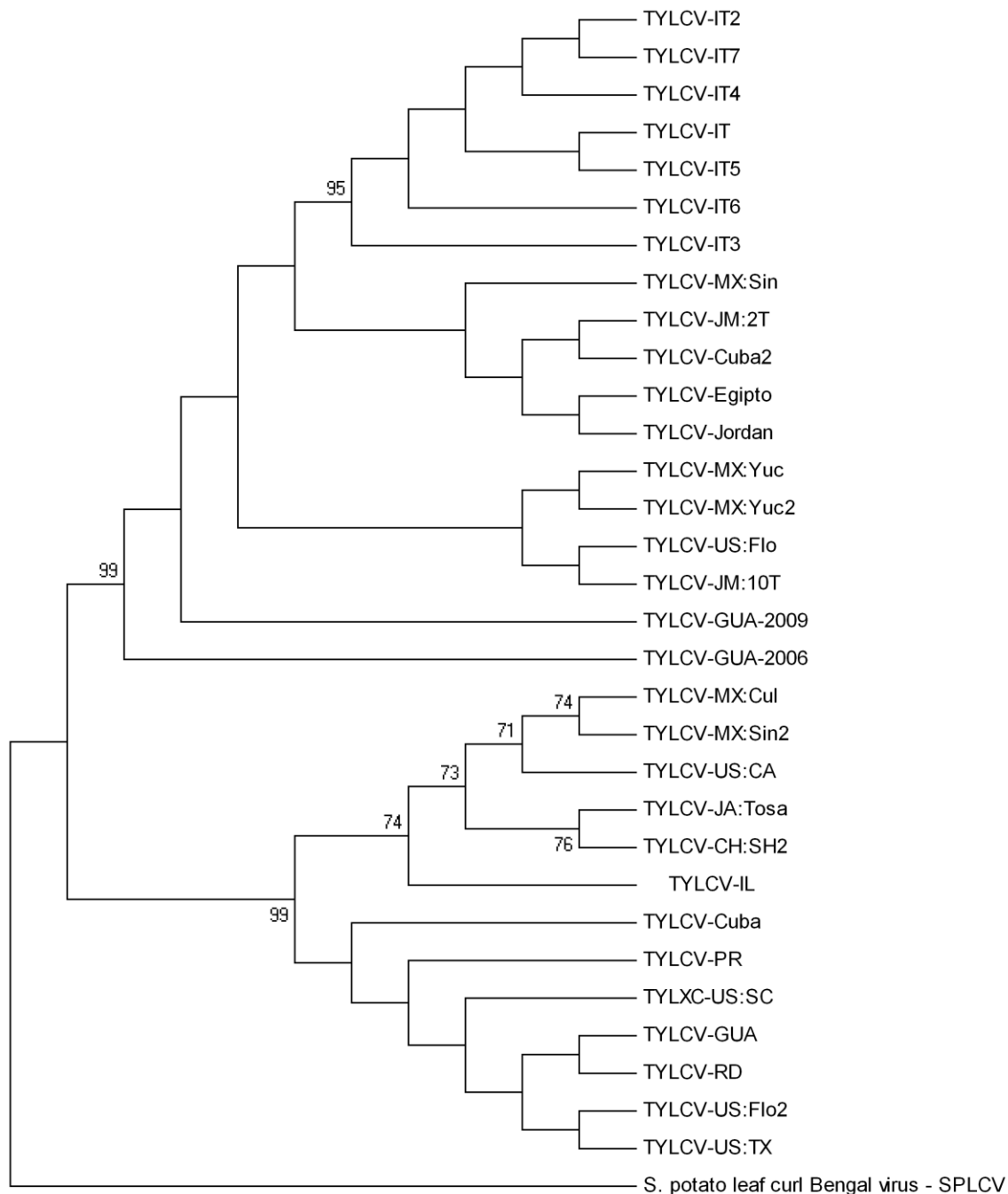


Figura 11. Análisis de Neighbor-joining de la secuencia de la región intergénica mostrando una predicción de la relación entre TYLCV encontrado en Guatemala en el año 2009 vs 2006 utilizando el software MEGA 4.1. El aislado encontrado en este estudio fue denominado TYLCV-GUA-2009 Puruhlá (número de acceso HM230692). Las líneas horizontales están en proporción al número de diferencias de nucleótidos entre los nodos con el método de máxima verosimilitud (Maximum Composite Likelihood) (rango 0-1, valores cercanos a 0 indican mayor similitud). Los números enteros representan el porcentaje de bootstrap que respalda cada nodo (1,000 réplicas). Sólo los valores con un bootstrap mayor que el 70% son mostrados. Para las abreviaciones de los nombres de los virus y el número de acceso, ver Cuadro 15 en sección de Anexos.



## IV. CONCLUSIONES

- A) Se determinó una incidencia (intervalo de confianza al 95%) de TYLCV en plantas de tomate del 2.4% (1.6-3.6%) y una incidencia en el vector *B. tabaci* de 0.7% (0.1-3.7%).
- B) Se optimizó la técnica de PCR para la detección del virus tanto en material vegetal como en el vector y se determinó que es útil para la detección de TYLCV ya que los resultados fueron confirmados mediante secuenciación, con un tamaño de 311 pb para la región intergénica. Además se ser una técnica de detección preventiva, ya que detecta el virus antes que aparezcan síntomas.
- C) Se determinó la incidencia en las cinco regiones propuestas con 2.1%, 2.2%,3.2%, 0.6% y 4.6% para las regiones norte, sur, oriente, occidente y centro, respectivamente. Con un 95% de confianza se puede decir que la distribución del virus en las cinco regiones es homogénea.
- D) La incidencia de TYLCV en el vector y la incidencia del TYLCV en el cultivo de tomate mantiene las mismas proporciones.

## V. RECOMENDACIONES

- A) Se recomienda realizar un monitoreo del virus a lo largo del tiempo para comparar si la incidencia aumenta o disminuye, ya que por ser un virus nuevo en Guatemala, se desconoce el comportamiento en los próximos años y puede ser la causa de un incremento en la producción de tomate.
- B) Analizar otros métodos de transmisión del virus para un mejor control, por ejemplo realizar estudios de la presencia del virus en otros cultivos, pilones o en otros posibles vectores.
- C) Verificar y/u optimizar la detección del virus en *B. tabaci* machos para tener una mejor idea del comportamiento del vector.
- D) Colectar muestras de plantas de tomate en diferentes etapas de crecimiento y relaciona porcentaje de incidencia con la producción del cultivo.

## VI. LITERATURA CITADA

- Altman, D. *et al.* 2005. *Statistics with confidence*. British Library Cataloguing in Publication Data. Segunda edición 240.
- Brown, JK y H. Czosnek. 2001. *Whitefly transmitted viruses*. Advances in Botanical Research, NY: Academic, 65-100.
- Brown, JK. *et al.* 2000. *The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses*. Archives of Virology. 146:1581-1598.
- Brown, JK. 2000. *Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-begomovirus complexes*. Virus Research 71:233-260.
- , 1997. *The Biology and Molecular Epidemiology of the Geminiviridae Subgroup III*. Plant-Microbe Interactions. 2:1-220.
- Cohen, H. y Y. Antignus. 1994. *Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne Geminivirus of Tomatoes*. Advanced Disease Vector Research, 10: 259-288.
- Czosnek, H.; N. Navot y H. Laterrot. 1990. *Geographical distribution of Tomato yellow leaf curl virus. A first survey using a specific DNA probe*. Phytopathology Mediterranean. 29:1-6.
- Czosnek, H. 2008. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*. Encyclopedia of Virology. Oxford: Elsevier. 138-145
- Fauquet, C.M, *et al.* 2003. *Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of Begomovirus species*. Archives of Virology. 148: 405 – 421.
- Forrest, N. 1997. *Quantifying the temporal dynamics of plant virus epidemics: a review*. Crop Protection. 7:603-618.
- Gafni, Y., y B.L. Epel. 2002. *The role of host and viral proteins in intra and inter-cellular trafficking of geminiviruses*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 60: 231-241.
- Ghanim, M. *et al.* 1998. *Evidence for transovarial transmission of Tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly Bemisia tabaci*. Virology, 240: 295-303.
- Gharsallah, S. *et al.* 2007. *First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Israel Species Infecting Tomato, Pepper and Bean in Tunisia*. Journal of Phytopathology 155, 236–240.
- Harrison, B. D. 1985. *Advances in geminivirus research*. Annual Review of Phytopathology. 23:55-82.

- Harrison, B. D. y D.J. Robinson. 1999. *Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses)*. Annual Review of Phytopathology 37:369-398.
- Herrera, L. *et al.* 1999. *Molecular techniques for the detection of tomato yellow leaf curl geminivirus in infected plants and viruliferous whiteflies*. Biotechn. Aplic. 16:237-241.
- Lazarowitz, S. G. 1992. *Geminiviruses: Genome and structure and gene function*. Review Plant Science. 11:327-349.
- Madden, L.V; G. Hughes y G.P. Munkvold. 1996. *Plant disease incidence: inverse sampling, sequential sampling, and confidence intervals when observed mean incidence is zero*. Crop Protection. 7:621-632.
- MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación: MAGA Guatemala, Centro América). 2008. *Programa de apoyo a los agronegocios*. Disponible en [http://portal.maga.gob.gt/portal/page/portal/uc\\_upie/documentos/tomate\\_agronegocios.pdf](http://portal.maga.gob.gt/portal/page/portal/uc_upie/documentos/tomate_agronegocios.pdf)
- Mehta, P. *et al.* 1994. *Transmission of Tomato yellow leaf curl virus by Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae)*. Journal of Economic Entomology, 87: 1291-1297.
- Mejía. L. 2006. *Híbridos resistentes para la producción sostenible del tomate*. Informe final. Proyecto AGROCYT 002:2002. Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 288.
- , 1999. *Evaluación de genotipos de tomate (Lycopersicon esculentum Mill) para resistencia a virus gémicos-transmitidos por mosca blanca y su detección por PCR*. Proyecto FONACYT No.28, Informe Final. Guatemala. 5
- Morales, F.J. y P.K. Anderson. 2001. *The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America*. Archives of Virology. 146:415-441.
- Morilla, G. *et al.* 2004. *Tete a Tete of Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Tomato Yellow Leaf Curl Sandinia Virus in Single Nuclei*. Journal of Virology. 78(19):10715-10723
- Moriones, E. y J. Navas-Castillo, 2000. *Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide*. Virus Research. 71, 123–134
- Moshe, L. *et al.* 2001. *Effect of Host Plant Resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on Virus Acquisition and Transmission by Its Whitefly Vector*. The American Phytopathological Society. 91(12):1209-1213.
- Nakhla, M. *et al.* 2005. *Molecular Characterization of Tomato-Infecting Begomoviruses in Central America and Development of DNA-Based Detection Methods*. Acta de Horticultura. 695:277-288.
- Nakhla, M. K. y D.P. Maxwell. 1998. *Epidemiology and management of tomato yellow leaf curl disease*. Plant Virus Disease Control. 565-583.
- Nakhla, M. K. *et al.* 1994. *Widespread occurrence of the eastern Mediterranean strain of tomato yellow leaf curl geminivirus in tomatoes in the Dominican Republic*. Plant Disease 78, 926.
- Nakhla, M.K.; H.M. Mazyad y D.P Maxwell. 1993. *Molecular characterization of four Tomato Yellow Leaf Curl Virus isolates from Egypt and development of diagnosis methods*. Phytopathologia Mediterranea. 32:163–173
- Navas-Castillo J. *et al.* 2000. *Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-Is and Tomato leaf curl virus*. Journal of General Virology. 81: 2797-2801

- Padidam, M., R.N, Beachy y C.M Fauquet. 1995. *Classification and identification of Geminiviruses using sequence comparisons*. General Virology. 76: 249 – 263
- Palanichelvam, K. *et al.* 1998. *The capsid protein of tomato yellow leaf curl virus binds cooperatively to single-stranded DNA*. Journal of General Virology. 79:2829–2833.
- Palmieri, M. *et al.* 1999. *Marcadores moleculares para la identificación y monitoreo de la distribución de geminivirus y biotipos de B. tabaci en plantaciones del sur y Valle de Motagua, en Guatemala*. FONACYT proyecto No. 21, Informe Final, Guatemala. p. 137.
- Pita, J. S. *et al.* 2001. *Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda*. Journal of General Virology. 82:655-665.
- Polston, J.E. y P.K. Anderson. 1997. *The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere*. Plant Disease. 81:1358-1369.
- Rubinstein, G. y H. Czosnek. 1997. *Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector Bemisia tabaci: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity*. Journal of general Virology. 78:2683-2689.
- Rubio L. *et al.* 2002. *Incidencia de los virus del rizado amarillo del tomate en cultivos de tomate de la Comunidad Valenciana, España*. Bol. San. Veg. Plagas, 28: 599-607.
- Rojas, A. *et al.* 2005. *Sequence characterization of Tomato leaf curl Sinaloa virus and Tomato severe leaf curl virus: Phylogeny of New World begomovirus and detection of recombination*. Archives of Virology. 1281-1299.
- Rojas, M. R. *et al.* 2001. *Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus*. Virology. 291:110-125.
- Sanz, A. *et al.* 2000. *Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan*. Journal of General Virology. 81: 1839-1849.
- Salati, R. *et al.* 2002. *Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: Characterization of an infection clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts*. Phytopathology. 92: 487- 496.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U. S. A.
- Siobain, D. y C. Holmes. 2007. *Multiple Introductions of the Old World Begomovirus Tomato yellow leaf curl virus into the New World*. Applied and environmental microbiology. 73(21): 7114–7117.
- Solares, E. 2007. *Presencia del TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus:Geminiviridae) en plantaciones de tomate (Lycopersicon esculentum L.) en Salamá, Sanarate y Asunción Mita*. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala, Guatemala. 73 pags.
- Tamura K, Dudley J, Nei M y Kumar S. 2007. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.

- Zambrano K. *et al.* 2007. *First report of Tomato yellow leaf curl virus in Venezuela*. Plant Disease. 91:768.
- Zar, JH. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey. Segunda edición. 663.
- Zhang , H.; H. Gong y X. Zhou. 2009. *Molecular characterization and pathogenicity of tomato yellow leaf curl virus in China*. Virus Genes (2009) 39:249–25.
- Zhang Y., J.K. Uyemoto y B.C Kirkpatrick. 1998. *A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay*. Journal of Virology. Methods 71:45–50.

## VII. ANEXOS

Cuadro 11. Fragmento de amplificación utilizando los cebadores PTYIRv21 y PTYIRc287 para la secuencia del genoma completo de TYLCV.

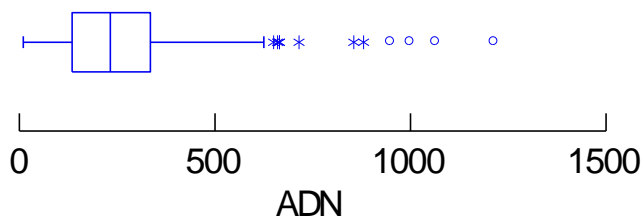
5'-

**accggatgcccgcgctttccittatggtgcccacgaggggttcacagacgtaactgcaaccaatcaaatgcatcccaaacgtagataagtggtca**  
**ttgctttataatac****GGTCCCAAGTTTTTGTCTTGCAA**atgtgggaccacttcaaatgaatttctgaatctgttcacggatttcgtgt  
atgttagctattaatattgcagtcctgtgaggaaactacgagcccaatacattggccacgatttaattaggatcttatctgttgaaggcccgtgac  
tatgtcgaagcgaccaggcgatataatcattccacgcccgtctcgaagggtccggaaggctgaacttcgacagccatacagcagccgtgctgtcc  
ccattgtccaaggcacaaacaagcgacgatcatggacgtacagcccatgtaccgaaagcccagaatatacagaatgatcgaagccctgatgtcccc  
gtggatgtgaaggcccatgtaaagtccagtctacgagcaacgggatgataaagcacactggtattgttcgtgtgtagtgatgttactcgtggatctgga  
attactcacagagtgggtaagaggtctgtgtaagtcgatatatttttagttaaagctggatggatgaaaatattaagaagcagaatcacactaatcagg  
tcatgttcttctgtccgtgatagaagccctatggaagcagcccaatggattttggacaggttttaatatgttcgataatgagcccagtaccgcaaccgtg  
aagaatgattgcgtgatagttcaagtgatgaggaatctcatgctacagttattgggtggccctctggaatgaaggaacaggcattagtaagagatttt  
taaaattaacagtcagttaactataatcatcaggaggcagccaagtacgagaaccatactgaaaacgcttattgtatatgcatgtacgcatgctct  
aatccagtgatgcaactatgaaaatacgcactctatttctatgattcaatatacaataataaattatattttatcatgagtttctgttacattattgtgtttca  
agtacatcatacaatacatgatcaactgctctgattacattattaatggaattacaccaagactatctaaatacttaagaactgatactaaatactctcaa  
gaaacgaccagctgaggctgtaatgctgctcaaatcggaagtgagaaaaattgtgaatccccattacctctgatgttggtggaactctatttgaat  
ggaaatgatgctgtggtcattgaaatggcctctgctgtgtctgttacttgaaatagagggtgattgtttatctccagataaaaacgccattctctgctg  
aggagcagtgatgagttcccctgtgctgtaatccatgattattgcaattgagatggaggtagtatgagcagccacagcttaggtctacacgcttacgccttat  
tggtttcttggctatctgtgtggacctgattgatacttgcgaacagtggtcgtagagggtgacgaaggttcattctgagagcccaattttcaaggat  
atatttttcttctctagataatccctatatgaggaggtaggctctgattgcagaggagatagtgggaattcccccttaatttgaatgggctcccgtact  
tgtgtgctttgccagtcctttggcccccatgaattccttgaagtctttaaagtaatcggggtctacgcatcaatgacggttaccacgcatcattattgtaca  
cctttgggcttaggtctagatgtccacataaataattatgtggcctagagacctggcccgaattgtttgcctgttctctatcacctcaatgacaatacttat  
gggtctccatggccgcgacggaaatatacagcgtctcagcagccattctcaagttcacttggaacttgataaaaagaagaataaataatggagaa  
acataaactctaaaggaggaactaaaaatcctatctaaattgaaactaaattatgaaattgcaaaatatagtcccttggggccttcttttaataattgagg  
gcctcggatttattgcctgaattgagtgcttcggcatatgcgtcgtggcagattgctgacctccttagctgatctgccatcgatttggaaaactccaaaatca  
atgaagctcctgctttcccacgtaggtcttgacatctgttgagctcttagctgctgaatgttcggatggaatgtctgatctgtttggggataaccaggtcg  
aagaaccgttggttcttaccattgtatttgcctcgaattggataagccatggagatgtggtccccattctcgtggagttctctgcaaaccttgatgtatttttat  
ttgtggggttctagtttttaattgggaaagtctcctctttagagagagaacatttgggatgttaagaataattttggcatatattttaaataaacgag  
gcatg**TGAAATGAATCGGTGTCCC****caa agctctatggcaatcgggtgatagggtcttattatacctggacacctaattggctatttgglaa**  
**ttctaaagacattgcaattcaaaattcaaaattcaaaatcaaatcattaaagcggccatcgtataatatt**-3'

Cuadro 12. Especificaciones de los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento de TYLCV.

<i>Característica</i>	<i>Cebador</i>	
	PTYIRv21	PTYIRc287
Temperatura anidación	64.6°C	68.6°C
Masa molecular	6132	7379
Pureza	31.8 µg/OD	30.6 µg/OD
Nanomoles de cebador	51.9	42.2

Figura 13. Box plot de la concentración de ADN para la determinación de la normalidad en los resultados. Se observa que la mediana está justo en el centro de la caja, por lo que es simétrica, a pesar de contener valores atípicos.



Cuadro 13. Concentración de ADN y pureza para las muestras de tomate.

<i>No. Muestra</i>	<i>Absorbancia</i>			<i>ADN µg/mL</i>	<i>Pureza</i>
	<i>A260</i>	<i>A280</i>	<i>A320</i>		
6	0.285	0.227	0.153	660	1.78
8	0.382	0.308	0.206	880	1.73
12	0.295	0.228	0.152	715	1.88
15	0.237	0.177	0.107	650	1.86
22	0.595	0.503	0.352	1215	1.61
28	0.195	0.125	0.062	665	2.11
33	0.079	0.048	0.021	290	2.15
34	0.082	0.058	0.035	235	2.04
38	0.079	0.049	0.021	290	2.07
40	0.084	0.055	0.028	280	2.07
47	0.087	0.06	0.032	275	1.96
48	0.088	0.048	0.021	335	2.48
49	0.071	0.05	0.027	220	1.91
52	0.286	0.168	0.073	1065	2.24

---

61	0.03	0.018	0.004	130	1.86
62	0.123	0.068	0.016	535	2.06
66	0.314	0.21	0.114	1000	2.08
68	0.168	0.108	0.055	565	2.13
69	0.099	0.067	0.036	315	2.03
75	0.026	0.018	0.011	75	2.14
76	0.084	0.074	0.058	130	1.63
80	0.026	0.023	0.019	35	1.75
84	0.003	0.002	0.001	10	2.00
86	0.025	0.018	0.008	85	1.70
89	0.008	0.007	0.004	20	1.33
90	0.004	0.003	0.002	10	2.00
98	0.09	0.087	0.063	135	1.13
99	0.111	0.095	0.08	155	2.07
104	0.009	0.007	0.001	40	1.33
108	0.024	0.017	0.009	75	1.88
109	0.273	0.242	0.173	500	1.45
110	0.028	0.015	0.003	125	2.08
113	0.045	0.03	0.012	165	1.83
114	0.08	0.062	0.037	215	1.72
117	0.086	0.059	0.031	275	1.96
122	0.165	0.105	0.05	575	2.09
123	0.051	0.033	0.015	180	2.00
128	0.074	0.044	0.018	280	2.15
130	0.59	0.5	0.4	950	1.90
133	0.087	0.058	0.031	280	2.07
136	0.018	0.009	0.001	85	2.13
138	0.052	0.038	0.021	155	1.82
139	0.036	0.024	0.011	125	1.92
146	0.09	0.05	0.011	395	2.03
150	0.088	0.045	0.009	395	2.19
151	0.069	0.039	0.012	285	2.11
153	0.073	0.064	0.046	135	1.50
154	0.029	0.022	0.013	80	1.78
157	0.02	0.013	0.006	70	2.00
158	0.031	0.018	0.003	140	1.87
166	0.051	0.03	0.01	205	2.05
167	0.054	0.033	0.013	205	2.05
171	0.081	0.058	0.032	245	1.88
172	0.112	0.091	0.04	360	1.41
181	0.352	0.32	0.219	665	1.32
183	0.026	0.015	0.002	120	1.85
188	0.031	0.019	0.01	105	2.33

---

---

189	0.058	0.038	0.012	230	1.77
190	0.041	0.029	0.008	165	1.57
194	0.51	0.495	0.48	150	2.00
197	0.121	0.099	0.05	355	1.45
199	0.089	0.048	0.009	400	2.05
200	0.091	0.068	0.039	260	1.79
209	0.085	0.049	0.011	370	1.95
215	0.091	0.053	0.02	355	2.15
217	0.039	0.029	0.018	105	1.91
221	0.051	0.025	0.005	230	2.30
223	0.048	0.028	0.011	185	2.18
224	0.059	0.04	0.012	235	1.68
229	0.063	0.031	0.002	305	2.10
333	0.055	0.038	0.02	175	1.94
338	0.058	0.045	0.03	140	1.87
339	0.085	0.051	0.025	300	2.31
345	0.05	0.03	0.013	185	2.18
349	0.031	0.015	0.004	135	2.45
356	0.045	0.028	0.009	180	1.89
358	0.062	0.035	0.011	255	2.13
369	0.069	0.04	0.018	255	2.32
370	0.071	0.053	0.031	200	1.82
371	0.075	0.038	0.002	365	2.03
379	0.099	0.062	0.028	355	2.09
381	0.04	0.028	0.012	140	1.75
382	0.036	0.024	0.011	125	1.92
385	0.058	0.03	0.004	270	2.08
388	0.249	0.229	0.189	300	1.50
390	0.185	0.12	0.06	625	2.08
391	0.08	0.049	0.02	300	2.07
392	0.085	0.059	0.029	280	1.87
400	0.028	0.02	0.009	95	1.73
403	0.095	0.059	0.025	350	2.06
404	0.021	0.014	0.007	70	2.00
405	0.08	0.048	0.019	305	2.10
406	0.565	0.509	0.394	855	1.49
410	0.015	0.009	0.002	65	1.86
414	0.12	0.069	0.018	510	2.00
420	0.16	0.109	0.062	490	2.09
425	0.075	0.05	0.028	235	2.14
430	0.078	0.07	0.054	120	1.50
433	0.083	0.055	0.018	325	1.76
440	0.12	0.068	0.02	500	2.08

---

445	0.084	0.049	0.016	340	2.06
450	0.068	0.038	0.01	290	2.07
452	0.023	0.018	0.008	75	1.50
453	0.082	0.051	0.02	310	2.00
455	0.038	0.022	0.008	150	2.14
463	0.065	0.054	0.04	125	1.79
469	0.087	0.049	0.003	420	1.83
477	0.04	0.031	0.02	100	1.82
483	0.023	0.018	0.011	60	1.71
499	0.065	0.046	0.02	225	1.73
501	0.076	0.049	0.02	280	1.93
514	0.087	0.055	0.01	385	1.71
525	0.095	0.076	0.045	250	1.61
527	0.065	0.038	0.01	275	1.96
533	0.03	0.02	0.009	105	1.91
547	0.034	0.024	0.012	110	1.83
550	0.06	0.04	0.02	200	2.00
554	0.087	0.065	0.035	260	1.73
560	0.09	0.078	0.06	150	1.67
562	0.065	0.045	0.02	225	1.80
574	0.086	0.065	0.034	260	1.68
580	0.054	0.032	0.009	225	1.96
588	0.03	0.021	0.01	100	1.82
592	0.048	0.029	0.009	195	1.95
599	0.025	0.018	0.009	80	1.78
608	0.06	0.052	0.04	100	1.67
617	0.128	0.11	0.09	190	1.90
621	0.321	0.29	0.254	335	1.86
630	0.09	0.07	0.045	225	1.80
633	0.054	0.033	0.009	225	1.88
			Media	<b>280.96</b>	<b>1.90</b>
			Desviación estándar	219.07	0.24

Cuadro 14. Clasificación por género y especie de mosca blanca

No.	F.Ingreso	<i>B. tabaci</i>			<i>T. vaporariorum</i>			<i>T. abutiloneus</i>
		Hembras	Machos	Ninfas	Hembras	Machos	Ninfas	Hembra
1	03/04/2009	15	5	0	0	0	0	0
2	03/04/2009	83	29	0	0	0	0	0
3	03/04/2009	55	26	0	0	0	0	0

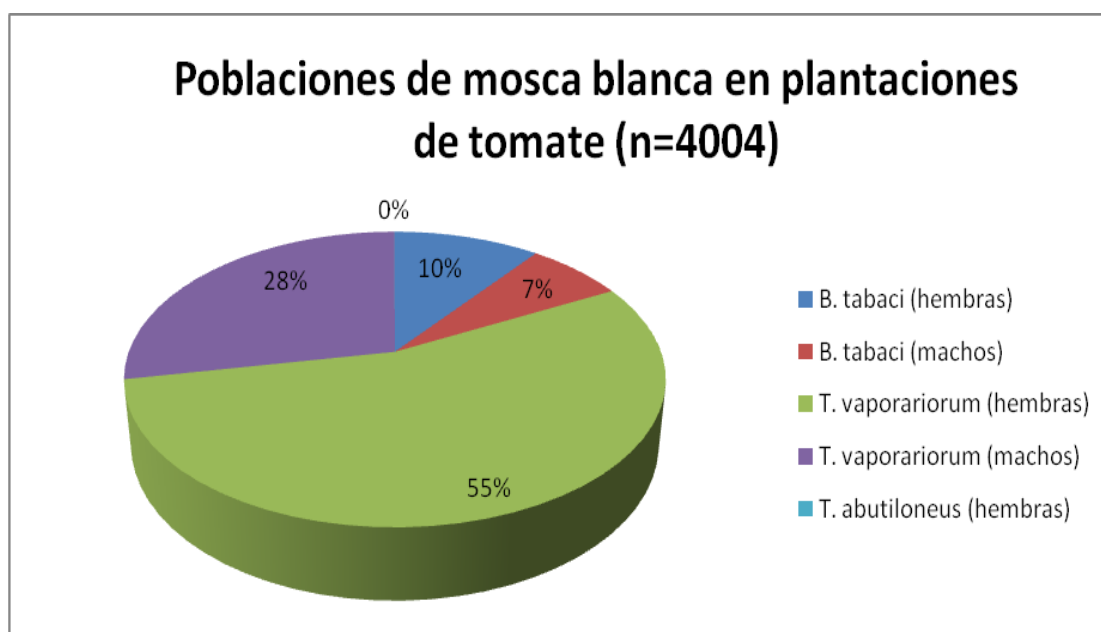
---

4	03/04/2009	15	6	0	0	0	0	0
5	18/04/2009	1	0	0	2	2	0	0
6	18/04/2009	16	7	0	41	26	0	0
7	18/04/2009	5	9	15	143	73	15	0
8	18/04/2009	2	1	0	76	25	0	0
9	18/04/2009	6	8	0	0	0	0	0
10	18/04/2009	8	0	0	1	1	0	0
11	18/04/2009	1	0	0	26	14	0	0
12	18/04/2009	3	0	1	6	5	4	0
13	18/04/2009	32	18	5	4	0	2	0
14	18/04/2009	6	0	0	17	4	0	0
15	18/04/2009	1	0	0	8	0	0	0
16	27/04/2009	0	0	0	39	8	0	0
17	27/04/2009	0	0	0	12	7	0	0
18	27/04/2009	1	0	0	5	0	0	1
19	27/04/2009	3	0	0	87	19	0	0
20	27/04/2009	2	2	0	85	26	0	0
21	27/04/2009	0	0	0	45	13	3	0
22	27/04/2009	0	0	0	183	28	0	0
23	27/04/2009	0	0	0	13	17	0	0
24	27/04/2009	3	1	0	32	20	0	0
25	27/04/2009	24	66	30	1	0	0	0
26	27/04/2009	2	1	0	0	0	0	0
27	27/04/2009	57	13	0	0	0	0	0
28	27/04/2009	57	68	5	0	0	0	0
29	13/05/2009	0	0	0	19	9	11	0
30	13/05/2009	3	0	0	1	1	0	0
31	13/05/2009	6	0	0	17	13	30	0
32	13/05/2009	0	0	0	57	129	0	0
33	15/05/2009	0	0	0	18	20	0	0
34	15/05/2009	0	0	0	16	12	0	0
35	15/05/2009	2	3	0	86	21	0	0
36	15/05/2009	0	0	0	63	66	30	0
37	15/05/2009	4	0	0	110	42	0	0
38	25/05/2009	1	0	0	7	8	0	0
39	25/05/2009	1	0	0	1	2	0	0
40	25/05/2009	0	0	0	10	17	0	0

---

41	25/05/2009	0	0	0	5	1	0	0
42	25/05/2009	0	0	0	522	217	0	0
43	25/05/2009	0	0	0	133	66	30	0
44	25/05/2009	0	0	0	166	136	6	0
45	25/05/2009	0	0	0	20	13	0	0
<b>Total</b>		<b>415</b>	<b>263</b>	<b>56</b>	<b>2077</b>	<b>1061</b>	<b>131</b>	<b>1</b>
<b>Gran total</b>					<b>4004</b>			

Grafico 14. Poblaciones de mosca blanca en plantaciones de tomate



Cuadro 15. Plantaciones de tomate utilizadas como puntos de muestreo

<i>Nombre plantaciones</i>	<i>No. Plantación</i>	<i>No. Tubo mosca</i>	<i>Latitud</i>	<i>Longitud</i>	<i>Altura</i>
Escuintla, Proesur	1	1871	14.33042	-91.0579	
Suchitepequez Cuyotenango, Finca La Ceibita	2	1	14.34447	-91.554	74
Retalhuleu, Caballo Blanco	3	2	14.47094	-91.8338	67.3
Retalhuleu, Caballo Blanco	4	3	14.507	-91.9358	30.3
Quetzaltenango Coatepeque, La Blanquita	5	4	14.65422	-91.7709	686
Santa Rosa, Aldea Amberez	6	5	14.38661	-90.3297	1029

---

Santa Rosa, Sta. Rosa de Lima, Aldea Amberez	7	6	14.38656	-90.3345	1031
Jalapa, Monjas Agua Caliente	8	7	14.73692	-89.8076	1005
Jalapa, Monjas Aldea Juan Cano	9	8	14.53147	-89.8601	996
Chiquimula Camotán, La Vegona	10	9	14.26508	-89.8568	526
Zacapa, La Unión Aldea Campanario	11	10	14.98506	-89.2791	1041
Zacapa, La Unión Finca San Aguatín	12	11	14.97083	-89.2844	965
Zacapa, La Unión Aldea Timushan	13	12	14.92622	-89.3183	1008
Zacapa, Gualán Finca Piedra Blanca	14	13	15.69111	-89.2373	621
El Progreso, Sanarate Finca Upayón (1)	15	14	15.64997	-90.1867	861
El Progreso, Sanarate Finca Upayón (2)	16	15	14.81394	-90.1906	849
Baja Verapaz, Salamá Sibabaj	17	16	15.06703	-90.2795	1005
Baja Verapaz, Salamá Finca El Valle	18	17	15.07611	-90.2811	983
Baja Verapaz, Salamá Llano Los Ramirez	19	18	15.12311	-90.3436	980
Baja Verapaz, Salamá Llano Los Ramirez	20	19	15.12844	-90.3393	939
Baja Verapaz, Salamá Los Molinos	21	20	15.05842	-90.2737	984
Alta Verapaz, Purula Walter Gomez	22	21	15.23633	-90.2454	1575
Alta Verapaz, Purula Mocua	23	22	15.23706	-90.2513	1563
Alta Verapaz, Tactic Aldea Tampo	24	23	15.324	-90.37	1460
Petén Poptún, Machaquila	25	24	16.39803	-89.4536	439
Petén Poptún, Canchacán	26	25	16.29378	-89.4158	449
Petén, San Luis Caserio La Ceibita	27		16.14633	-89.4401	293
Petén, San Luis Caserio La Ceibita, Las 2 G	28	26	16.1425	-89.4388	291
Izabel Morales, Rancho Grande	29	27	15.46331	-88.8322	47
Izabel Morales, Aldea Oneida La Vega	30	28	15.43697	-88.8298	42.7
Guatemala, Villa Nueva Barcenás ENCA	31	29	14.54064	-90.6098	1444
Guatemala, Amatitlán Villa Romana	32	30	14.50822	-90.6157	1463
Guatemala, Amatitlán Aldea El Rincón	33	31	14.44739	-90.6308	1191
Chimaltenango, Patzicia La Joya	34	32	14.64867	-90.8356	2115
Sacatepequez, Santa Lucia Milpas Altas	35	33	14.57219	-90.6424	1876
Guatemala, Guatemala UVG	36	34	14.50556	-90.7417	
Guatemala, Palencia Pie del cerro La Montañita	37	35	14.65461	-90.3897	1577
El Progreso, San Antonio La Paz Los Planes	38	36	14.72414	-90.2776	1574
El Progreso, San Antonio La Paz Los Planes	39	37	14.72047	-90.2768	1578
Quiche, Sacapulas Caserio San Gorge	40	38	15.27739	-91.1194	1205
Huehuetenango, Colotenango Aldea Xemal	41	39	15.40422	-91.6919	1523
Huehuetenango, San Gaspar	42	40	15.39122	-91.7247	1407
El Arenal Semeon Perez					

---

Huehuetenango, San Gaspar		41	15.39125	-91.7301	1399
El Arenal Macario Barrios	43				
San Marcos, Tejutlá Aldea Cuya		42	15.15683	-91.8549	2540
Florencio Gonzales	44				
San Marcos, Tejutlá Aldea Teodomino Barrios	45		15.15481	-91.8478	2508
Quetzaltenango, Zunil Aldea Estancia de la Cruz	46	43	14.83167	-91.507	1784
Quetzaltenango, Zunil Aldea, Esteban Poy	47	44	14.74778	-91.5056	1785
Solola, Santa Lucia Utatlán El Mirador Delfina	48	45	14.75172	-91.294	2023
Petén, Flores			16.9	-89.9	

Cuadro 16. Número de acceso a base de datos GeneBank

<i>Origen</i>	<i>Nombre</i>	<i>No. de acceso</i>	<i>nt</i>
	TYLCV-Flo	AY530931	2781
	TYLCV-US:Flo	AF260331	1320
Estados Unidos	TYLCV-US:SC	DQ139329	806
	TYLCV-US:TX	EF110890	2752
	TYLCV-CA	EF539831	2781
Israel	TYLCV-IL	X15656	2787
República Dominicana	TYLCV-RD	AF024715	2781
	TYLCV-JM:2T	U84146	315
Jamaica	TYLCV-JM:10T	U84147	312
México	TYLCV-MX:Yuc	AF168709	753
Cuba	TYLCV-Cuba2	AF414089	630
Egipto	TYLCV-Egipto	L12219	312
Jordania	TYLCV-Jordan	EU143755	634
Japón	TYLCV-JA:Tosa	AB192965	2781
China	TYLCV-CN:SH2	AM282874	2781
Guatemala	TYLCV-GUA	GU355941	2781
	TYLCV-IT	EU719084	664
	TYLCV-IT2	DQ317730	784
	TYLCV-IT3	EU719081	664
Italia	TYLCV-IT4	EU719079	664
	TYLCV-IT5	EU719078	664
	TYLCV-IT6	EU719077	664
	TYLCV-IT7	EU719075	664

Figura 15. Secuencias con alineamientos significativos

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">AF168709.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus replication associated protein	<a href="#">466</a>	466	99%	3e-128	98%	<a href="#">G</a>
<a href="#">U84147.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus origin of replication between	<a href="#">466</a>	466	99%	3e-128	98%	
<a href="#">AF414089.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus replication-associated protein	<a href="#">460</a>	460	99%	1e-126	98%	
<a href="#">AF260331.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus replication-associated protein	<a href="#">460</a>	460	99%	1e-126	98%	
<a href="#">U84146.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus origin of replication between	<a href="#">455</a>	455	99%	6e-125	97%	
<a href="#">L12219.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus replication origin DNA	<a href="#">455</a>	455	99%	6e-125	97%	
<a href="#">EU143755.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus from cucumber C1, C4, and V	<a href="#">449</a>	449	99%	3e-123	97%	
<a href="#">DQ058093.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus haplotype N C1 protein and V	<a href="#">444</a>	444	99%	1e-121	96%	
<a href="#">EU719081.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:I-160 replication-a	<a href="#">438</a>	438	99%	6e-120	96%	
<a href="#">EU719079.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:I-16 replication-ass	<a href="#">438</a>	438	99%	6e-120	96%	
<a href="#">EU719078.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:I-11 replication-ass	<a href="#">438</a>	438	99%	6e-120	96%	
<a href="#">EU719077.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:I-10 replication-ass	<a href="#">438</a>	438	99%	6e-120	96%	
<a href="#">EU719075.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:I-3 replication-asso	<a href="#">438</a>	438	99%	6e-120	96%	
<a href="#">DQ317730.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:T570:02 replication	<a href="#">438</a>	438	99%	6e-120	96%	
<a href="#">EU719080.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:I-148 replication-as	<a href="#">435</a>	435	99%	8e-119	96%	
<a href="#">EU719084.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:I-217 replication-as	<a href="#">433</a>	433	99%	3e-118	96%	
<a href="#">EU719076.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:I-4 replication-asso	<a href="#">433</a>	433	99%	3e-118	96%	
<a href="#">EU719074.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:I-2 replication-asso	<a href="#">433</a>	433	99%	3e-118	96%	
<a href="#">DQ317728.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:T535:02 replication	<a href="#">433</a>	433	99%	3e-118	96%	
<a href="#">DQ317727.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:T529:02 replication	<a href="#">433</a>	433	99%	3e-118	96%	
<a href="#">AJ812277.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus complete genome, isolate Me	<a href="#">433</a>	433	99%	3e-118	96%	<a href="#">G</a>
<a href="#">DQ317731.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:T573:02 replication	<a href="#">431</a>	431	99%	1e-117	96%	
<a href="#">DQ317729.1</a>	Tomato yellow leaf curl virus isolate IT:T568:02 replication	<a href="#">431</a>	431	99%	1e-117	96%	

Cuadro 17. Reactivos a utilizados

<i>Reactivo</i>	<i>Marca</i>
Tris-HCl	Sigma
EDTA	Sigma
Proteínasa K	Promega
Deoxinucleótidos trifosfatados	Promega
Taq ADN polimerasa	Promega
Marcador de masa molecular de 1Kb	Promega
DNTP's	Promega
Acetato de Sodio	Merck
Isopropanol	Merck
Alcohol Isoamilico	J. T. Baker
Cloroformo	Merck
Cloruro de sodio	Merck
Etanol	Distribuidora Mario Bathen
Acetato de Amonio	J. T. Baker
Nitrógeno líquido	Productos del Aire

Cuadro 18. Equipo utilizado

---

<i>Equipo</i>
Microscopio de luz
Estereoscopio
Vortex
Microcentrífuga
Sistema de captura de imágenes en UV
Cámara de electroforesis horizontal
Fuente de poder para cámara de electroforesis horizontal
Termociclador
Campana para PCR
Horno microondas
Horno de convección (hasta 250°C)
Cuarto frío -4°C
Espectrofotómetro
Micropipetas
Congelador -20°C
Congelador -80°C

---