

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Monitoreo de la incidencia de 4 especies de *Begomovirus*
(*Geminiviridae*) en mosca blanca (*Bemisia tabaci*) recolectadas en 5
valles tomateros de Guatemala, como parte de un programa de manejo
integrado de tomate

Trabajo de graduación presentado por Lucía Ortiz Batsche para optar el
grado de licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2007

Monitoreo de la incidencia de 4 especies de *Begomovirus*
(*Geminiviridae*) en mosca blanca (*Bemisia tabaci*) recolectadas en 5
valles tomateros de Guatemala, como parte de un programa de manejo
integrado de tomate

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Monitoreo de la incidencia de 4 especies de *Begomovirus*
(*Geminiviridae*) en mosca blanca (*Bemisia tabaci*) recolectadas en 5
valles tomateros de Guatemala, como parte de un programa de manejo
integrado de tomate

Trabajo de graduación presentado por Lucía Ortiz Batsche para optar el
grado de licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2007

Vo. Bo.

(f) _____
Licenciada Margarita Palmieri

Tribunal

(f) _____
Licenciada Margarita Palmieri

(f) _____
Licenciado Andrés Ávalos

(f) _____
Doctor Héctor Aguilar

Fecha de aprobación: Guatemala, 18 junio del 2007

PREFACIO

Este estudio formó parte del proyecto “Monitoreo de la infección de diferentes begomovirus de *B. tabaci*, en campos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), como criterio de alerta para establecer períodos libres de hospederos de begomovirus o períodos adecuados para la siembra de tomate en diferentes regiones del país”; con Margarita Palmieri como investigadora principal, financiado con fondos de las instituciones CATIE-FASAGUA y AGROCYT. Como parte de un programa nacional para controlar las infecciones por geminivirus.

Para realizar el estudio se monitoreó durante un año la incidencia de los cuatro begomovirus más frecuentes en Guatemala. La detección se llevó a cabo por PCR con imprimadores degenerados como tamizase e iniciadores específicos para la identificación. En una segunda parte, se comparó el patrón de bandas mediante polimorfismo en la conformación de filamentos de ADN monocatenario (SSCP) del producto de PCR. Una de las limitaciones del estudio, consistió que en ocasiones no fue posible la colecta del número establecido de individuos de mosca blanca, debido a la disponibilidad de éstos en el campo; además del número reducido de muestras que se procesó.

Las colectas estuvieron a cargo de CATIE-FASAGUA y la parte práctica se realizó en los laboratorios de Protección Vegetal, Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, a quien agradezco por permitir llegar a cabo esta investigación.

Agradezco especialmente a la Licenciada Margarita Palmieri por su asesoría y por permitirme ser parte de su grupo de investigadores.

Al Doctor Aguilar por su orientación durante toda mi carrera universitaria.

A mis compañeros del laboratorio de Protección Vegetal, quienes me dieron su amistad y colaboración. Especialmente a Elena y Andrés por su enorme paciencia y constante ayuda y consejos.

A mis compañeros y Amigos, Laura, Melany, Mishel, Luis, Fredy, Marco, Estuardo y Wendy por toda su apoyo y amistad. Además de amigos y personas que de alguna forma contribuyeron en la realización de este estudio.

Finalmente, a mis Padres y Hermanos por todos sus sacrificios y constante apoyo y cariño.

ÍNDICE

	Página
PREFACIO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE CUADROS	x
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Cultivo de tomate en Guatemala	3
B. Geminivirus	4
C. Vectores de begomovirus	15
D. Efectos negativos de la virosis por begomovirus transmitidos por mosca blanca a plantaciones de tomate	19
E. Técnicas de diagnóstico de begomovirus	20
F. Métodos de control	22
G. Estudios realizados previamente en Guatemala	23
III. JUSTIFICACIÓN	24
IV. OBJETIVOS	25
V. HIPÓTESIS	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. RECOMENDACIONES	43
X. LITERATURA CITADA	44
XI. APÉNDICES	47

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Épocas de cosecha de tomate en Guatemala	3
2	Síntomas de infección por geminivirus observados en muestras de tejido vegetal de tomate	8
3	Otros síntomas de geminivirus observados en las plantaciones de tomate	9
4	Ciclo de vida de la mosca blanca	16
5	Diagrama de flujo del método que se realizó	27
6	Lugares muestreados	29
7	Disposición de omatidios de las especies más comunes de mosca blanca	30
8	Segmento final del abdomen de la mosca blanca para diferenciar sexos	31
9	Porcentaje de hembras <i>B. tabaci</i> colectadas en los cinco valles tomateros durante febrero 2006 a enero 2007	34
10	Porcentaje de muestras positivas para begomovirus general detectadas en los cinco valles muestreados	35
11	Incidencia de virosis detectada en <i>B. tabaci</i> recolectadas en los diferentes valles tomateros durante febrero 2006 a enero 2007	36
12	Períodos de veda y siembra sugeridos para los lugares muestreados de acuerdo la incidencia de virosis	38
13	Incidencia de virosis detectada en <i>T. vaporarorium</i> colectadas en los diferentes valles tomateros durante febrero 2006 a enero 2007	55
14	Porcentaje de hembras recolectadas en Salamá durante febrero 2006 a enero 2007	55

15	Porcentaje de hembras recolectadas en Laguna Retana durante febrero 2006 a enero 2007	56
16	Porcentaje de hembras recolectadas en Valle Central durante febrero 2006 a enero 2007	56
17	Porcentaje de hembras recolectadas en Esquipulas durante febrero 2006 a enero 2007	57
18	Porcentaje de hembras recolectadas durante feb-2006 a ene-2007 en Santa Rosa	57
19	Incidencia de virosis en Salamá durante febrero 2006 a enero 2007	58
20	Incidencia de virosis Laguna de Retana durante febrero 2006 a enero 2007	58
21	Incidencia de virosis en Área central durante febrero 2006 a enero 2007	59
22	Incidencia de virosis en Esquipulas durante febrero 2006 a enero 2007	59
23	Incidencia de virosis en Santa Rosa durante febrero 2006 a enero 2007	60
24	Incidencia de virus específico en Salamá durante febrero 2006 a enero 2007	60
25	Incidencia de virus específico en Laguna de Retana durante febrero 2006 a enero 2007	61
26	Incidencia de virus específico en Área central durante febrero 2006 a enero 2007	61
27	Incidencia de virus específico en Esquipulas durante febrero 2006 a enero 2007	62
28	Incidencia de virus específico en Santa Rosa durante febrero 2006 a enero 2007	62
29	Fotografía de un gel de agarosa con productos de PCR utilizando imprimadores degenerados	63
30	Fotografía de un gel de agarosa con productos de PCR utilizando imprimadores específicos para detección de <i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	63
31	Fotografía de un gel de agarosa con productos de PCR utilizando imprimadores específicos para detección de	64

	<i>Tomato severe leaf curl virus, Tomato havana mosaic virus y Pepper golden mosaic virus</i>	
32	Fotografía de un gel de poliacrilamida al 30% para establecer los patrones de bandas, pero sin especificar el específico	64
33	Fotografía del gel de poliacrilamida al 30% para establecer los patrones de bandas de las moscas individuales, positivas para begomovirus específico	65
34	Fotografía del gel de poliacrilamida al 30% con productos de PCR utilizando imprimadores específicos para detectar <i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	65
35	Fotografía del gel de poliacrilamida al 30% con productos de PCR utilizando imprimadores específicos para detectar <i>Tomato severe leaf curl virus, Tomato havana mosaic virus</i> y <i>Pepper golden mosaic virus</i>	66

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Organización de los genes de begomovirus, sus funciones y nomenclatura	6
2	Criterios de demarcación de especies del género	10
3	Virus identificados en Centroamérica y el Caribe hasta 1994	11
4	Características de algunos geminivirus que afectan el hemisferio occidental	13
5	Incidencia de begomovirus encontrados en Centro América	14
6	Costo adicional que causan las enfermedades por geminivirus en el cultivo de tomate en Guatemala	19
7	Coordenadas de los puntos muestreados	30
8	Coeficientes de correlación entre el porcentaje de hembras <i>B. tabaci</i> y la virosis presente	37
9	Porcentaje de virus específico detectado en hembras <i>B. tabaci</i> en los diferentes valles tomateros muestreados durante febrero 2006 a enero 2007	52
10	Porcentaje de las especies identificadas en los valles muestreados durante febrero 2006 a enero 2007	53
11	Porcentaje de virus general detectado en hembras de <i>B. tabaci</i> en los diferentes valles tomateros muestreados durante febrero 2006 a enero 2007	54
12	Porcentaje de virus general detectado en hembras de <i>T. vaporarorium</i> en los diferentes valles tomateros muestreados durante febrero 2006 a enero 2007	54

RESUMEN

Los begomovirus transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* son causa de innumerables pérdidas en cultivos de solanáceas (principalmente tomate y chile) y cucurbitáceas (entre ellas, melón). En Guatemala, miembros de la familia de los begomovirus han causado daños en la zona agrícola. Debido al uso de pesticidas como método principal de control para los vectores de éstos, se ha aumentado el deterioro del ambiente y salud, con una solución parcial al problema.

Durante este estudio se tomaron mensualmente muestras de mosca blanca, en cinco valles tomateros de Guatemala, desde febrero 2006 a enero 2007. Se identificó y determinó la presencia de begomovirus general y cuatro específicos.

Se analizaron 545 muestras de *B. tabaci* y 303 de *T. vaporarorium*, colectadas en Salamá, Laguna de Retana, área central, Esquipulas y Santa Rosa. De éstas se detectó el 62.5% y 32.5% de muestras positivas, respectivamente. Lo que evidencia un incremento con relación a otros estudios similares realizados en años anteriores.

Con el fin de obtener información de su comportamiento en diferentes regiones y establecer si es posible implementar períodos de veda o identificación nuevas especies, se analizó la incidencia de begomovirus general y de cuatro especies (*Pepper huasteco yellow vein virus*, *Pepper golden mosaic virus*, *Tomato mosaic havana virus* y *Tomato severe leaf yellow mosaic virus*) mediante PCR con imprimadores degenerados y específicos. Se analizó el patrón de bandas característico del producto de PCR usando los cebadores degenerados, por polimorfismo en la conformación de filamentos de ADN monocatenario (SSCP) con el fin de identificación preliminar de nuevas especies (no identificadas con los imprimadores específicos). De esta manera, tomar en cuenta su diversidad para considerar la implementación de programas de control de las cepas y especies de geminivirus en los diferentes cultivos.

Se observaron dos incrementos en cuanto al porcentaje de virosis, uno entre final y principios de año (meses posteriores a las lluvias) y el otro posterior a los meses con menos virulencia. Estadísticamente ($\alpha=0.05$) se encontró que la distribución tanto de begomovirus general como los específicos antes mencionados, es igual en todos los lugares muestreados. Con base en ello, se propuso un período de veda en cada lugar (considerando la mayor virulencia): Salamá julio-septiembre, Laguna de Retana agosto-octubre, área central noviembre-enero, Esquipulas octubre a diciembre y Santa Rosa

mayo a julio. Se identificó un patrón de bandas para *Pepper golden mosaic virus*, *Tomato mosaic havana virus* y *Pepper Huasteco yellow vein virus* pero no en *Tomato severe leaf curl virus*.

I. INTRODUCCIÓN

En Guatemala, el tomate es una de las hortalizas más cultivadas, pero a partir de 1987 los productores han venido afrontando el problema del acolchamiento del follaje, una enfermedad provocada por miembros de la familia de los begomovirus. Éstos son transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* y son causa de innumerables virosis en diferentes cultivos. Se estiman pérdidas del 70% a 90% de la producción debidas a estas infecciones virales.

En este país, los begomovirus han causado daños en la zona agrícola, ya que exhiben resistencia cruzada a varias clases de insecticidas, no es posible controlarlos por métodos convencionales. Como resultado, estos virus sido reconocidos como patógenos virales emergentes y de suma importancia económica en regiones donde se cultiva tomate, frijol, melón, chile pimiento y yuca. Las enfermedades causadas por geminivirus son mencionadas reiteradamente como la limitante biótica para la producción de tomate en América tropical.

Estas epidemias están asociadas con los cambios en las prácticas de siembra, así como la constante plantación de tomate que aumenta la cantidad de hospederos de su vector natural (*B. tabaci*). Debido a que los cultivos resistentes a esta plaga no están disponibles, la alternativa es la aplicación continúa de insecticidas. Ello aumenta el deterioro del ambiente y salud, con una solución parcial al problema. En otros países, entre ellos República Dominicana, se han implementado medidas alternas como vedas, que junto con otros programas de manejo integrado han ayudado a reducir drásticamente la virosis.

Dado el potencial del tomate para ser un cultivo de exportación (especialmente en los mercados de México y Estados Unidos) y el uso en la agroindustria de la pasta de tomate, es necesaria la implementación de nuevas medidas que minimicen los costos adicionales a su producción. Al hacerlo se tendría un alto impacto en la economía regional y nacional. Se estima que al exportar tomate y chile pimiento (ambos hospederos de geminivirus) se podrían generar alrededor de 20 a 30 millones de dólares en divisas y 20 mil empleos directos (en un plazo de 5 años). El tomate y chile guatemalteco además de tener el acceso a Estados Unidos, el mayor mercado se exportaría a Canadá, México y la región Centroamericana.

El objetivo principal de este estudio es determinar la incidencia de virosis de begomovirus a través del monitoreo de su vector principal. Con base a ello, proponer un período de veda en los distintos valles productores de tomate, como método alternativo al control de esta plaga. Durante los períodos libres de hospederos o vedas, se elimina la fuente de inóculo de geminivirus, así las siguientes generaciones de mosca no lo adquieren y por tanto no son infectivas. Luego de la veda, se espera que disminuya la cantidad de virus que circula en el campo y por tanto que se reduzca la posibilidad de infección del cultivo. Posterior al desarrollo de la planta, si ésta adquiere el virus, la producción de frutos no es afectada. Esto ayudará a desarrollar otras estrategias más efectivas para control de la enfermedad e implementar medidas preventivas.

Con el uso de vedas o períodos libre de hospederos, se espera a largo plazo, racionar el uso de pesticidas para obtener cosechas de mayor calidad a menor precio para el consumidor y reducir las pérdidas de producción.

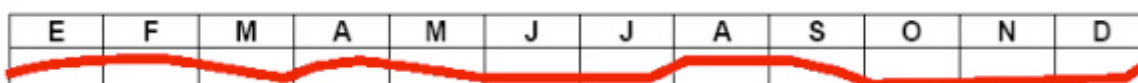
II. ANTECEDENTES

A. Cultivo de tomate en Guatemala

En promedio al año se cosechan entre 5.800 y 7.100 hectáreas y las variedades que se utilizan principalmente son Roma, Sheriff, Helios, Silverado, Zenith. El ciclo vegetativo es de 90 a 120 días, el área cosechada varía entre 5.800 – 7.100 (ha/año) y la producción varía entre 172.300 – 189.500 (tm/año) (Arias 2003).

De acuerdo con la información publicada por la Unidad de Políticas e Información Estratégica de Guatemala con respecto a la producción de tomate en este país (figura 1), se tiene que hay cosechas de tomate todo el año, pero principalmente en enero, febrero, abril, mayo, agosto y septiembre (Arias 2003).

Figura 1
Épocas de cosecha de tomate en Guatemala (Tomado de Arias 2003)



En Guatemala, se siembran aproximadamente 10,000 manzanas de tomate. Entre las principales zonas productoras de este cultivo se encuentran Salamá, Monjas, Laguna de Retana, El progreso, El Amatillo, Ipala, Esquipulas, Gualán, Santa Rosalía, Zacapa, Agua Blanca, Asunción Mita, Sanarate, Amatitlán, Villa Nueva, San Raymundo, Sumpango, Nueva concepción, Santa Rosa y Quiché. Además hay pequeñas plantaciones en todo el país. En cuanto a empleos, el cultivo de tomate, genera 15,000 en su producción y 10,000 en su comercialización (Palmieri *et al.* 2006).

El rendimiento promedio por manzana es de 1,200 cajas de 50 libras. Es un cultivo que responde a la implementación de alta tecnología en su producción (Palmieri *et al.* 2006).

En Salamá se cultivan 2000 manzanas, equivalentes a 1400 ha (1 Mz = 0,7 ha) de tomate. Los productores se estratifican en grandes (más de 10 Mz.), medianos (5 a 10 Mz) y pequeños (menos de 5 Mz). Una buena productividad se considera 2000 cajas de 50 libras por manzana (equivalente a 65 mil kg/ha), mientras que la media es de solamente 1000 cajas. Se identifica como el problema de mayor importancia a las deficiencias de manejo del cultivo, aunque presenta como problemas serios a las bacteriosis, fungosis, y virosis (principalmente geminivirus) (MAGA 2006).

Para la región de Jutiapa, se estimó que se cultivarían unas 2000 Mz (1400 ha). En Esquipulas se reportan 200 ha de tomate. De la entrevista y la visita al terreno, queda muy claro el problema del complejo mosca blanca asociado a las virosis. El potencial de producción regional es muy superior a los niveles actuales. La apertura del mercado a otros destinos, la agroindustria de la pasta de tomate y la exportación tendrían un alto impacto regional y nacional. El costo de producción se informa en 40 mil Quetzales/Manzana (MAGA 2006).

El cultivo de tomate podría ser de mucha importancia para Guatemala, al acceder a los mercados de México y Estados Unidos. Con estos se podría incrementar considerablemente el área sembrada actualmente. Al minimizar los costos por virosis, puede ser considerado un cultivo para exportación (especialmente en los mercados de México y Estados Unidos). Se estima que al exportar tomate y chile pimiento (ambos hospederos de geminivirus) se podría generar alrededor de 20 a 30 millones de dólares en divisas y 20 mil empleos directos (en un plazo de 5 años). El tomate y chile guatemalteco además de tener el acceso a Estados Unidos (el mayor mercado), se exportaría a Canadá, México y la región Centroamericana (MAGA 2006).

B. Geminivirus

Los geminivirus son una familia de virus patógenos de plantas que ocasionan considerables pérdidas y daños en numerosos cultivos alrededor del mundo, distribuyéndose principalmente en zonas tropicales y subtropicales. Son transmitidos por insectos vectores a una gran variedad de plantas mono y dicotiledóneas. La distribución geográfica del vector es la responsable de la dispersión del geminivirus que transmite (Vega y Rivera 2001), causando pérdidas económicas importantes en hortalizas, cultivos básicos e industriales (De la Torre *et. al.* 2002).

Su genoma está constituido por 1 ó 2 moléculas de ADN simple hebra (ADNsh). Su nombre deriva de la morfología de su partícula, ya que semejan dos poliedros unidos regulares e idénticos (gemi= gemelos) (De la Torre *et. al.* 2002). Son circulares, ambisentido y forman un círculo cerrado. El largo total es de 2,500-3,000 o 4,800-5,600 nucleótidos. Los genomas multipartitos están divididos en diferentes partículas, cada una es encapsidada independientemente de la otra. Los viriones son icosaédricos, no envueltos, de 38nm de largo y 22nm de diámetro, contienen 22 capsómeros por nucleocápside (ICTVdB Management 2006).

Los genomas virales codifican proteínas estructurales y no estructurales, sin embargo no se ha reportado la síntesis de lípidos. Por si mismo el ácido nucleico no es infeccioso, en especies bipartitas se necesitan ambos componentes para producir infecciones sistémicas (ICTVdB Management 2006).

Todos los miembros codifican una proteína de cobertura de 28-34 kDa y otra de replicación (Rep) de 41 kDa que inicia la replicación en forma de *rolling circle*. Contienen una región intergénica que incluye una secuencia conservada de nucleótidos (TAATATTAC), en donde se inicia la síntesis del ADNsh (Antoniw y Adams 2007).

Además del interés que los geminivirus despertaron como agentes causales de enfermedades con importancia económica, el tener un genoma de ADN atrajo la atención para explorar la posibilidad de usarlos como vectores para la introducción de material genético en plantas (Vega y Rivera 2001).

1. Subgrupos. De acuerdo con el insecto vector que los transmite, el tipo de planta hospedera que infectan y su estructura genómica, los geminivirus se pueden clasificar en cuatro géneros (Antoniw y Adams 2007) o tres subgrupos definidos (De la Torre *et. al.* 2002): *Mastrevirus*

(subgrupo I), *Curtovirus* (subgrupo II), *Begomovirus* (subgrupo III) y *Topocuvirus* (Méndez *et al.* 2003). Las principales características de cada uno son:

- Los *Mastrevirus* son monopartitas, con genoma ligeramente más pequeño que el de los otros géneros, segmentado y codifica 3 ó 4 proteínas (Antoniw y Adams 2007). Son transmitidos por diferentes especies de chicharritas e infectan monocotiledóneas (Rivera y Ruiz 1997).
- Los *Curtovirus* tienen genoma segmentado, monopartito y codifica 7 proteínas (Antoniw y Adams 2007). También son transmitidos por chicharritas, pero infectan dicotiledóneas. (Rivera y Ruiz 1997).
- Los *begomovirus* contienen dos genomas segmentados (bipartitas). Son transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) e infectan plantas dicotiledóneas. A la fecha en Centro América y México, sólo se han registrado virus pertenecientes a este género (Rivera y Ruiz 1997).
- Los *Topocuvirus* tienen un genoma segmentado que codifica 6 proteínas (Antoniw y Adams 2007). Es transmitido por diferentes vectores, entre ellos artrópodos o insectos del orden Hemiptera, familia Aleyrodidae, Membracidae; *Bemisia tabaci* y *Micrutalis malleifera* (ICTVdB Management 2006). Difiere de los otros monopartitas, ya que su genoma codifica 6 proteínas e infecta plantas dicotiledóneas (Antoniw y Adams 2007). Este género fue aprobado en 1999 por la ICTV, debido ello, en la literatura únicamente se mencionan los otros tres géneros (Danforth *et al.* 2003)

En este trabajo se estudiará únicamente geminivirus del subgrupo III:

a. *Begomovirus*. Los geminivirus del subgrupo III o *begomovirus* son causa de serias enfermedades en plantas tanto cultivadas como silvestres. Tiene un genoma de ADN pequeño, circular, bipartita (componente A y B) de banda y sentido positivo, encapsidado (cápside icosaédrica) (Ramírez 1994). El genoma completo consta de 5096-5286-5570 nucleótidos. No se han secuenciado completamente los componentes A y B. El primero consiste de aproximadamente 2,588-2,870 nucleótidos y el segundo de 2,508-2,724 nucleótidos. La proporción de guanina es 21-22.31-23.5 %; adenina 26-27.76-29 %; citosina 18.3-18.71-19.8 % y timina 30.2-31.2-32.6 % (ICTVdB Management 2006).

La organización genómica de los geminivirus del subgrupo III es bastante conservada, inclusive entre los geminivirus monopartitos recientemente incorporados a este subgrupo. El componente A contiene toda la información que las proteínas virales requieren para la replicación, transcripción y encapsidación del ADN del virus, mientras que el componente B codifica para las proteínas involucradas en el movimiento célula a célula y el movimiento sistémico del virus en la planta, así como en el movimiento núcleo-citoplasma.

En el cuadro 1 se muestra la organización genómica del PHV (*Pepper huasteco virus*) como representante del subgrupo III, además se presentan las funciones de los genes y su nomenclatura.

Cuadro 1
Organización de los genes de begomovirus, sus funciones y nomenclatura (Tomado de Rivera y Ruiz 1997)

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

En el componente A se encuentran las funciones virales requeridas para la replicación y encapsidación. En el componente B se encuentran los genes involucrados en el movimiento del virus en la planta. Los miembros monopartitos de este grupo (por ejemplo, los diferentes aislados del virus del enrollamiento amarillo de la hoja del tomate, TYLCV) presentan una organización genómica similar al componente A de los bipartitos. Sin embargo, es común que estos virus presenten un marco de lectura abierta adicional que se traslapa con la parte inicial del gen de la proteína de la cápside (Rivera y Ruiz 1997).

Recientemente se ha dado a conocer la naturaleza multifuncional de varias proteínas virales. Por ejemplo, la proteína Rep presenta características muy similares al antígeno T del SV40 y se cree que puede alterar el ciclo celular en una célula infectada. Se encuentra que, al menos en el caso del virus del mosaico dorado del tomate, éste es capaz de inducir la expresión de la proteína llamada PCNA, una proteína accesoria a la ADN polimerasa δ (replicativa). Asimismo, hay varios ejemplos donde se muestra una interacción entre una proteína viral y la proteína celular retinoblastoma. Esta proteína ha sido involucrada en diferentes mecanismos de control del ciclo celular. No está todavía claro si el virus logra que una célula diferenciada entre otra vez al ciclo celular o solamente induce parte de la maquinaria de síntesis de ADN. De cualquier forma, por primera vez se tiene en plantas un sistema adecuado para estudiar diferentes procesos del ciclo celular (Vega y Rivera 2001).

Por otro lado, análisis de las regiones promotoras de varios genes virales han mostrado que, aparentemente, los geminivirus han “secuestrado” una serie de señales de regulación propias de algunos genes de la planta. Esto permitiría a los virus tener un patrón de regulación y expresión que facilitará la replicación de virus en las células vegetales. También se ha sugerido que el virus ha aprendido a inducir genes que son requeridos para su replicación (Vega y Rivera 2001).

b. Etiología. Los begomovirus se encuentran dentro de los virus de plantas de mayor importancia económica en el mundo actual, no sólo por los daños que causan, sino por la diversidad de cultivos que afectan. Se han convertido en patógenos emergentes, incrementándose en número,

distribución e importancia en las últimas décadas, considerándolos la peste del siglo (Martínez *et al.* 2003).

En el contexto global, América Latina ha sido la región más afectada en términos de números totales de geminivirus transmitidos por la mosca blanca, número de cultivos afectados, pérdidas en la producción y área devastada por estos patógenos. En la actualidad, alrededor de 5 millones de hectáreas de plantas cultivables en 20 países se encuentran bajo el ataque de más de 30 geminivirus diferentes (Martínez *et al.* 2003).

Desde aproximadamente 10 años, las virosis provocadas por geminivirus han afectado seriamente la producción varios cultivos de importancia económica de Guatemala como tomate, frijol, curbitáceas, chile pimiento y yuca. (Mejía).

En Mesoamérica, entre las familias de los cultivos en riesgo para este virus se encuentran *Convolvulaceae* (camote y batata), *Cucurbitaceae* (sandía melón, zapallo, moranga, pipián, tamalayote, ayote, calabaza y auyama), *Leguminosae* (frijol, habichuelas y caraota), *Malvaceae* (algodón, okra, molondrón) *Solanaceae* (chile dulce, chiltoma, pimentón, tomate, tabaco, berenjena y papa) (Mejía y Dardón 1994).

En América Central, la incidencia es del 100% durante las estaciones secas y las pérdidas pueden alcanzar hasta el 60% de los cultivos. Estas epidemias están asociadas con los cambios en las prácticas de siembra, así como la constante plantación de tomate que aumenta la cantidad de hospederos de su vector natural (*B. tabaci*). Debido a que los cultivos resistentes a esta plaga no están disponibles, la alternativa es la aplicación continua de insecticidas (Nakhla *et al.* 2005).

c. Síntomas. Los síntomas de la infección por geminivirus son diversos, varían de acuerdo a la especie de virus y cepa, cultivo, edad de la planta al momento de la infección y condiciones ambientales (Poltson y Anderson 1997).

En ocasiones se presenta como un ligero acolchamiento en las hojas, que puede confundirse con deficiencia de magnesio. Después, las hojas se encrespan alargando sus últimos internodos con flores débiles y pequeñas. Otras veces se presenta un acolchamiento más severo, con hojas pequeñas encrespadas, la floración ocurre únicamente una vez. Además, pobre crecimiento, al mes de transplantada la planta desarrolla raíz de 5-8 cm y empieza a florecer, sin responder a la fertilización. Las hojas son quebradizas, de color oscuro con los bordes púrpura (algunos lo confunden con la alcalinidad del suelo). Ocurre un abortamiento del 90% de sus flores, aunque se apliquen productos estimulantes (Salgero 1994).

Por otro lado, pueden presentarse combinaciones de: mosaico amarillo brillante, moteados cloróticos, márgenes foliares cloróticas, rizado de las hojas, deformación de las hojas, arrugas o pliegues en las hojas, reducción en el tamaño de las hojas, crecimiento menor de las plantas infectadas, y abscisión de la flor (Poltson y Anderson 1997). Es importante mencionar que cuando una planta tiene

infecciones mixtas, los síntomas se distorsionan. A la fecha, no han caracterizado la sintomatología de infecciones mixtas (Méndez *et al.* 2003). En Guatemala se han observado plantaciones con algunos de los síntomas antes descritos:

Figura 2
Síntomas de infección por geminivirus observados en muestras de tejido vegetal de tomate



Mosaico, enaciones, acolochamiento (hacia abajo y arriba), puntos necróticos localizados



Mosaico, enaciones, amarillamiento, acolochamiento (hacia abajo y arriba), deformación de hojas y venas, necrosis en la orilla de la hoja, punto necróticos localizados



Enrollamiento hacia arriba, enaciones, clorosis, necrosis en la orilla



Mosaico, enrollamiento hacia abajo, enaciones, algunos puntos necróticos localizados



Mosaico y bronceado de las hojas, enaciones (posible combinación con TSWV)



Bronceado, enaciones, mosaico

Fuente: Ávalos, A. y E. Dardón, Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 3
Otros síntomas de geminivirus observados en las plantaciones de tomate



Clorosis general en la planta adulta



Bronceado, enrollamiento hacia adentro, clorosis, necrosis



Clorosis, necrosis general en las plantas

Fuente: Ávalos, A. y E. Dardón, Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala.

d. Especies. La diversidad de los geminivirus transmitidos por moscas blancas se ha comenzado a estudiar recientemente, sin embargo, se desconoce la epidemiología de este grupo de virus, lo que representa grandes problemas para el manejo de las enfermedades que causan. Esta diversidad puede ser ilustrada con la infamación actual sobre los geminivirus que infectan tomates en las diferentes regiones del mundo. El *Tomato yellow curl virus* (TYLVCV) ha sido conocido como el causante más importante de pérdidas en la región mediterránea y se creía que era bipartito. Otros reportes han demostrado que el TYLVCV proveniente de Israel, Italia y Australia es monopartito, contrario al aislado en Tailandia (TYLVCV-Th) que es bipartito. Otro ejemplo es que el virus *Pepper huasteco* (PHV) encontrado en México presenta algunos genes semejantes a los geminivirus del hemisferio occidental como el TYLVCV. La explicación hipotética es la existencia de un virus ancestral común, seguida de un proceso de divergencia al adaptarse a los diferentes insectos y plantas hospederas (Ramírez y Maxwell 1994).

Se ha sugerido que los geminivirus bipartitos son capaces de intercambiar información de pequeños fragmentos desde algunos hasta 2,000 nucleótidos (Fauquet y Stanley 2003) por

pseudorecombinación y por recombinación intramolecular (Ramírez y Maxwell 1994). Estos mecanismos logran dar origen a nuevas especies o cepas. Por tal razón, se estableció un criterio para diferenciar entre nuevas especies y cepas, con base en el porcentaje de similitud en la secuencia de su genoma (Fauquet y Stanley 2003).

Se estableció entre 57% y 89% en similitud de secuencias para considerarse una misma especie y del 87% al 100% para considerarse cepas (Fauquet y Stanley 2003).

El objetivo es diferenciar entre nuevas especies y cepas, especialmente en cuanto al diagnóstico y control de enfermedades específicas, de acuerdo a la epidemiología y evolución del virus (Fauquet y Stanley 2003). De esta manera, tomar en cuenta su diversidad para considerar la implementación de programas de control de las cepas y especies de geminivirus en los diferentes cultivos (Mejía y Dardón 1994). En el cuadro 2 se muestran los criterios de demarcación de especies del género *Begomovirus* para considerar la aparición de una nueva especie:

Cuadro 2
Criterios de demarcación de especies del género *Begomovirus* (Tomado de Fauquet y Stanley 2003)

Carácter	Criterio
Genoma	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diferentes números en los componentes del genoma ▪ No hay transcomplementación de los productos de los genes ▪ No hay pseudorecombinaciones entre componentes
Secuencia de genomas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Secuencias de nucleótidos idénticas en el componente A inferiores al 89%
Proteínas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diferentes reacciones inmunológicas a anticuerpos monoclonales
Transmisión	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diferentes vectores
Rango de hospederos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diferentes rangos de hospederos

Por ejemplo, los geminivirus del subgrupo III que afectan el tomate en Costa Rica son diferentes a los detectados en Nicaragua y Guatemala. Recientemente se ha puesto el nombre *Tomato severe leaf crumple virus* (TSLCrV) para virus presentes en Guatemala, Honduras y Nicaragua y *Tomato leaf crumple virus* (TLCrV) para el presente en México (Mejía y Dardón 1994).

e. Begomovirus identificados en los países centroamericanos y del Caribe. Hasta 1994 había reportes de siete grupos principales de begomovirus en Centroamérica, México y el Caribe, clasificados según la posición 805 del N-terminal del gen *Rep*, que se mencionan a continuación:

- Virus del mosaico dorado (BGMV)-tipo II, incluye aislamientos de Puerto Rico, República Dominicana y Guatemala.
- Virus del mosaico dorado (BGMV)-tipo I, aislamientos de Brasil
- Virus del enanismo del fríjol (BDMV) incluye el virus del mosaico del abutilón (AbMV), virus moteado del tomate (ToMoV) y virus del encrespamiento de la hoja del tomate (TLCrV).

- Virus del enrollamiento de la hoja de calabaza (SqLCV), incluye cepas R y E del AqLCV, virus del mosaico dorado calopogonium (CalGMV), virus del pimentón de Texas (TPV), virus del mosaico cálico del frijol (BCMoV) y virus del encrespamiento severo de la hoja del tomate (TSLCrV).
- Virus huasteco del pimentón (PHV)
- Virus del mosaico dorado del tomate (TGMV)
- Virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV)

(Mejía y Dardón 1994).

Es interesante notar que los geminivirus que infectan el frijol se encuentran en cuatro de los siete grupos. Se cree que han al menos seis virus que infectan al tomate en Centroamérica, México y el Caribe, pero no han sido caracterizados adecuadamente (Mejía y Dardón 1994).

En este estudio también se realizó la identificación con base a sintomatología (en el caso del virus del enanismo del frijol, por medio de pruebas de transmisión). Se utilizaron otras técnicas inmunológicas (ELISA) y moleculares (hibridización con sondas radioactivas o PCR). Los resultados por país se muestran en el cuadro 3:

Cuadro 3
Virus identificados en Centroamérica y el Caribe hasta 1994 (Tomado de Mejía y Dardón 1994)

Nombre del virus identificado	Cultivo/planta infectada	País
Mosaico dorado del frijol (BGMV)	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>P. acutifolius</i> <i>Calopogon mucura</i> <i>Macroptilium</i> <i>Rhynchosia</i> spp. <i>Sida</i> spp. <i>Euphorbia</i> sp. <i>Erythrina</i> spp.	Guatemala El Salvador Honduras Nicaragua Costa Rica Panamá República Dominicana Haití Cuba Jamaica
Mosaico cálico del frijol (BCMoV)	<i>P. vulgaris</i>	México
Mosaico del kenaf	<i>Hibiscus cannabinus</i> <i>Dature stramonium</i>	El Salvador
Clorosis infecciosa del algodón	<i>Wissadula amplisima</i> <i>Malva parviflora</i> <i>Gossypium hirsutum</i> <i>G. hirsutum</i> <i>Sida</i> spp.	Guatemala República Dominicana Nicaragua
Mosaico amarillento del tomate (TYMV)	<i>Lycopersicum esculentum</i>	El Salvador Costa Rica Panamá
Virus no caracterizado del tomate	<i>L. esculentum</i>	Costa Rica Nicaragua El Salvador Honduras República Dominicana

Nombre del virus identificado	Cultivo/planta infectada	País
Virus chino del tomate (CdTV)	<i>L. esculatum</i> <i>Jatropha</i> <i>Gossyfolia</i> <i>Euphorbia</i> <i>Heterophilla</i> <i>Sida</i> spp.	República Dominicana Guatemala El Salvador Costa Rica
Virus del enrollamiento de la hoja del ayote (SqLCV)	<i>L. esculatum</i>	República Dominicana Guatemala
Virus del acolochamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV)	<i>L. esculatum</i>	República Dominicana
Virus del mosaico dorado del tomate (TGMV)	<i>L. esculatum</i>	República Dominicana
Virus del encrespamiento severo de la hoja del tomate (TSCrV)	<i>L. esculatum</i>	Guatemala Honduras Nicaragua
Virus del encrespamiento de la hoja del tomate (TLCrV)	<i>L. esculatum</i>	México
Grupo de geminivirus en melón	<i>Cucumis melo</i>	Guatemala
Enrolamiento de la hoja del ayote (SqCLV)		Honduras Costa Rica

Por otro lado, en Guatemala, hasta 1999 se analizó tejido vegetal con síntomas de “acolochamiento” de varias muestras provenientes de Sanarate. En ellas se identificaron tres especies de begomovirus, *Tomato severe leaf curl virus-Guatemala* (ToSLCV-GT), *Tomato mottle virus-Guatemala* (ToMoV-GT) y *Pepper golden mosaic virus-Guatemala* (PepGMV-GT). *Tomato mottle virus-Guatemala* pertenece a la familia AbMV (*abutilon mosaic*) en la cual se encuentran otros virus infecciosos del tomate del hemisferio occidental; *Tomato severe leaf curl virus-Guatemala* y *Pepper golden mosaic virus-Guatemala* pertenecen al grupo filogenético del SqLCV (*Squash leaf curl*) (Mejía 1999).

Todos estos virus se encuentran presentes en infecciones mixtas. *Pepper golden mosaic virus-Guatemala* también fue detectado en tomate y chile pimiento. *Tomato severe leaf curl virus-Guatemala* fue aislado en tomate y pepino, mientras que *Tomato mottle virus-Guatemala* sólo en tomate (Mejía 1999). En estudios más recientes (2005), se han descrito ocho virus (para tomate y chile) encontrados en Centro América: PepGMV (*Pepper golden mosaic virus*)

- PHYVV (*Pepper huasteco virus*)
- ToLCSinV (*Tomato leaf curl sinaloa virus*)
- ToMHV (*Tomato mosaic havana virus*)
- ToMiMoV (*Tomato mild mottle virus*)
- ToGMoV (*Tomato golden mottle virus*)
- ToSLCV (*Tomato severe leaf curl virus*)
- ToYMoV (*Tomato mottle taino virus*)

(Nakhla *et al.* 2005)

De éstos los más frecuentes en Guatemala son *Pepper golden mosaic virus*, *Pepper huasteco yellow vein virus*, *Tomato leaf curl sinaloa virus* y *Tomato mosaic havana virus* (Nakhla et al. 2005)

Es necesario tomar en cuenta la inminente presencia del virus del enrollamiento de la hoja del tomate (TYLCV) en estas regiones. Éste aunque es originario del hemisferio oriental, han sido reportado casos en República Dominicana y Jamaica, y no se descarta la posibilidad que se haya esparcido a las otras regiones (Mejía y Dardón 1994). A la fecha ya ha sido confirmado en Guatemala por especialistas, basándose en la sintomatología de la plantas, sin embargo es necesario llevara a cabo pruebas de diagnóstico para confirmarlo (Palmieri, M, Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala, palmieri@uvg.edu.gt, Comunicación personal).

Debido que la mayoría de los geminivirus se han descubierto recientemente, algunos de ellos no han sido caracterizados completamente y no hay información suficiente. A continuación se listan las especies de begomovirus señalados como causa de virosis en tomate en el hemisferio occidental, documentados los síntomas principales, así como su aparición en otros lugares no mencionados anteriormente (Anderson y Polton 1997).

Cuadro 4
Características de algunos geminivirus que afectan el hemisferio occidental (Tomado de Anderson y Polton 1997).

Virus	Distribución conocida	Síntomas en tomate	Otros hospederos (aparte del tomate)
Virus del chino del tomate (CdTV)/Virus rugoso de la hoja del tomate (TLCrV)	México (Chiapas, Morelos, Sinaloa, Tamaulipas)	Rizado severo de la hoja, enrollamiento de la hoja, mosaico amarillo, engrosamiento de las venas, enanismo, reducción en la producción de frutos.	Experimental: El ámbito de hospedantes incluye 19 especies de 4 familias, Campo: no reportado
Virus huasteco del pimentón (PHV)	México (Guanajuato, Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas), EEUU (Texas)	Aclareo de venas, distorsión leve de las hojas, clorosis, enanismo	Experimental: <i>Capsicum annum</i> Campo: <i>C. annum</i>
Virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV)	Guadalupe, Martinica, Puerto Rico, Trinidad y Tobago, Venezuela	Moteado clorótico, rizado de la hoja, distorsión de la hoja	Experimental: Especies de <i>Datura</i> , <i>Petunia</i> , <i>Nicotiana</i> Campo: <i>Solanum tuberosum</i>
Virus del mosaico dorado del pimentón Serrano (SGMV)	México (Sinaloa), EEUU (Arizona)	Rizado de la hoja, distorsión de la hoja, enanismo	Experimental: <i>C. annum</i> , <i>C. frutescens</i> , <i>Datura stamonium</i> Campo: <i>C. annum</i> , <i>C. Frutescens</i>
Virus del enrollamiento foliar del tomate de Sinaloa (STLCV)	México (Sinaloa)	Clorosis y amarillamiento foliar, rizado de la hoja, internodos reducidos	Experimental: <i>C. annum</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Solanum melongena</i> , <i>Malva parviflora</i> Campo: no reportado
Virus taino del moteado del tomate (TTMoV)	Cuba	Rugosidad, deformación y rizado de las hojas, enanismo	Experimental: <i>C. annum</i> Campo: no reportado
Virus tejano del pimentón (TPV)/Virus del chile jalapeño (PJV)	México (Coahuila, Sinaloa, Tamaulipas), Guatemala, EEUU (Arizona, Texas)	Mosaico, rizado de la hoja, enanismo	Experimental: <i>C. annum</i> , <i>C. frutescens</i> , <i>D. stramonium</i> , 4 <i>Nicotiana spp.</i> , <i>Physalis wrightii</i> Campo: <i>C. annum</i> , <i>C. frutescens</i> , <i>N. glauca</i>
Geminivirus del tomate BZ-Ub	Brasil (Minas Gerais)	Mosaico Amarillo	No reportados
Geminivirus del tomate BZ-Ig	Brasil (Minas Gerais)	Mosaico Amarillo	No reportados
Virus del mosaico dorado del tomate (TGMV)	Brasil	Mosaico Amarillo	Experimental: <i>D. stramonium</i> , 5 <i>Nicotiana spp.</i> , <i>Physalis sp.</i> Campo: no reportado

Virus	Distribución conocida	Síntomas en tomate	Otros hospederos (aparte del tomate)
Virus del moteado del tomate (ToMoV)	Puerto Rico, EEUU (Florida, ocasionalmente en: Carolina del Sur, Tennessee, Virginia)	Moteado clorótico, rizado de la hoja, enanismo de la planta, reducción en el tamaño y número de frutos	Experimental: <i>Lycopersicon spp.</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> Campo: <i>Solanum viarum</i>
enrollamiento foliar amarillo del tomate (TYLCV)	Cuba, República Dominicana, Jamaica	Reducción el tamaño de la hoja, bordes cloróticos, moteado clorótico, abscisión floral, enanismo severo de la planta	Experimental: el ámbito de hospedantes incluye especies en aproximadamente 10 familias Campo: <i>Boerhavia erecta</i> , <i>Cynanchum acutum</i> , <i>D. stramonium</i> y otras
Virus del mosaico amarillo del tomate (TYMV)	Venezuela	Mosaico amarillo, rizado de la hoja, enanismo	Experimental: <i>D. stramonium</i> , 2 <i>Lycopersicon spp.</i> , <i>Nicandra physaloides</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>Petunia hybrida</i> , <i>Physalis peruviana</i> Campo: no reportadas
Virus del moteado amarillo del tomate (ToYMoV)	Costa Rica	Moteado clorótico, distorsión de la hoja, rizado de la hoja, enanismo	No reportados
Virus del rayado amarillo de la nervadura del tomate (ToYVSV)	Brasil (São Paulo)	Mosaico Amarillo, hojas onduladas	Experimental: <i>Solanum tuberosum</i> Campo: no reportado
Geminivirus 1 del tomate (TomatoGV1)	Guatemala, Honduras, Nicaragua	Rizado severo de la hoja, moteado de la hoja o clorosis	No reportados
Geminivirus 2 del tomate (TomatoGV2)	Guatemala	No reportados	No reportados

f. Incidencia de los Begomovirus identificados en los países centroamericanos y del Caribe. Se han llevado a cabo estudios para determinar la incidencia de estos virus en plantas por medio de PCR o hibridación. En el cuadro 5 se muestran los porcentajes anuales detectados para cada virus descrito en Centro América:

Cuadro 5
Incidencia de begomovirus encontrados en Centro América (Tomado de Nakhla *et al.* 2005)

Lugar	fecha	Porcentaje de incidencia (%)							
		Virus general	ToSLCV	ToGMoV	ToMiMoV	ToMHV	ToYMoV	ToLSinV	PepGMV
Guatemala	1999	58	17	0	0	0	0	0	8
	2000	92	38	62	31	23	0	15	8
	2001	100	100	100	0	100	0	0	0
	2002	100	100	80	40	20	0	60	20
	2003	100	85	62	23	31	0	23	31
	2004	100	81	100	50	50	0	13	13
Honduras	1998	67	100	0	67	50	0	0	0
	1999	100	50	0	0	63	0	0	0
	1999	100	75	0	0	100	0	0	0
Costa Rica	1994	100	0	0	0	0	100	0	0
	1996	100	0	0	0	0	33	67	0
Nicaragua	1992	100	0	0	50	0	0	50	0

ToSLCV: *Tomato severe leaf curl virus*; ToGMoV: *Tomato golden mottle virus*; ToMiMoV: *Tomato mild mottle virus*; ToMHV: *Tomato mosaic havana virus*; ToYMoV: *Tomato mottle taino virus*; ToLSinV: *Tomato leaf curl sinaloa virus*; PepGMV: *Pepper golden mosaic virus*

El estudio fue realizado con plantas que presentaban síntomas por begomovirus, la detección se realizó por medio de cebadores o sondas específicos a cada tipo de virus, además de iniciadores degenerados para detección de begomovirus general. No se realizó la detección para PHYVV (*Pepper huateco yellow vein virus*) (Nakhla *et al.* 2005).

En síntesis, se considera que la identificación de virus o cepas virales y su incidencia, así como las fuentes de inóculo y su diseminación como componentes prioritarios. Deben ser considerados en los planes epidemiológicos para diseñar, entender y manejar el complejo mosca blanca-geminivirus en la región (Mejía y Dardón 1994).

C. Vectores de begomovirus

1. *Bemisia tabaci*. Son insectos de la familia *Aleyrodidae*, conocidos comúnmente como moscas blancas. Los adultos tienen el cuerpo recubierto de una fina capa de polvo blanco de aspecto harinoso (aleyron = harina), producido por unas glándulas ventrales. Se trata de una especie polífaga que parasita más de 300 especies de plantas, pertenecientes a más de 63 familias botánicas, incluyendo ornamentales, malas hierbas y cultivos hortícolas (Naranjo 2004).

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

Las especies de mosca blanca presentan cuatro estados diferenciados: huevo, larva, pupa y adulto (ver figura 4). A su vez el estado de larva tiene tres estadios (I, II y III). Existen algunas discrepancias en la utilización del término pupa, que no lo es realmente, ya que existe alimentación en la primera parte del estado, y la transformación en adultos se produce en la parte final del mismo, sin que exista una muda pupal (Naranjo 2004).

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

La hembra deposita preferentemente los huevos en el envés de las hojas, unidos a ellas mediante un pedicelio que es insertado en el tejido hospedante, aunque en algunos cultivos prefiere el haz. Los huevos se disponen de forma aislada, en grupos irregulares o en semicírculos, los cuales traza a modo de abanico con su abdomen sin moverse del sitio, pues no abandona su actividad de comer mientras los pone. Pueden o no estar recubiertos por una secreción cerosa blanca (Naranjo 2004).

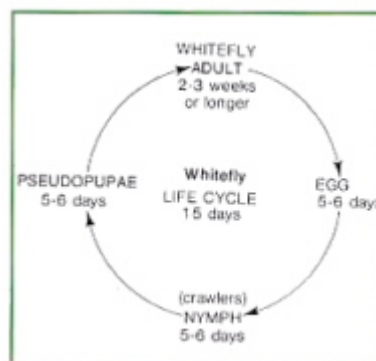
El estado larvario dura aproximadamente un mes. Durante los tres primeros estadios, la larva se alimentará succionando jugo de la planta de tal forma que, en caso de que ésta se secase o muriese, ella también moriría. En el primer estadio se mueve unos pocos milímetros para buscar su propio lugar y clava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

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

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

Figura 4

Ciclo de vida de la mosca blanca (Tomado de Bohmfalk *et al.* 2004)



3. Taxonomía. En el mundo se han identificado aproximadamente 1,200 especies, aunque se estima que el número sea superior. La mayoría (724), se encuentra distribuida en zonas tropicales, mientras que 420 especies han sido descritas para las regiones templadas. Desde el punto de vista

económico las dos especies más importantes son: *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* (Carabali 2004).

Estas especies son consideradas una de las plagas más importantes en la agricultura tropical y subtropical, como también en los sistemas de producción bajo invernadero. Desde los años ochentas ocasiona pérdidas económicas en el sur de los Estados Unidos, México, Venezuela, Cuenca y Este del Caribe, Centro y Sur América, dada su comprobada eficiencia como vector de virus, unida al daño que causa la alimentación directa y la excreción de melaza. Las *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Malvaceae*, *Solanaceae* y *Euphorbiaceae* son las familias con mayor número de especies hospederas (Carabali 2004).

Las moscas blancas se presentan como un gran complejo integrado por, al menos, once especies: *Aleurotrachelus socialis*, *Trialeurodes variabilis*, *Bemisia tuberculata*, *Aleurothrixus aepim*, *Bemisia tabaci*, *Bemisia argentifolii*, *Trialeurodes abutiloneus*, *Aleurodicus dispersus*, *Paraleyrodes* sp., *Aleuronudus* sp. y *Tetraleurodes* sp.. Debido a la alimentación directa y transmisión de virus, ocasionan severas reducciones en el rendimiento de las raíces y constituyen una de las principales plagas. *A. socialis* es la especie predominante en la zona norte de Suramérica y, en menor proporción, en Brasil. *B. tuberculata* y *T. variabilis* han sido registradas en bajas densidades en Brasil, Colombia y Venezuela. *B. tabaci* tiene una distribución tropical generalizada África, América, Asia. El rango geográfico actual de *B. tabaci* incluye a Japón, Canadá y Holanda, donde afecta amplias áreas de cultivos bajo invernadero (Carabali 2004).

4. Transmisión de begomovirus. Existen tres etapas para la transmisión de los virus: adquisición del virus desde una planta infectada, retención del virus en el vector e inoculación de éste en una planta sana. Los virus persistentes circulativos como geminivirus transmitidos por *B. tabaci*, son aquellos que necesitan ser adquiridos desde el floema de la planta y transportados hasta la cavidad hemolinfática (hemocele) después de atravesar el digestivo posterior. Luego de la hemolinfa, el virus baja hasta las glándulas salivares accesorias donde la lámina basal forma vesículas alrededor de la partícula viral mediante pinocitosis que luego son transportadas por exocitosis hasta el canal salivar. Finalmente, los viriones son transportados desde el canal salivar a la planta durante la salivación en tejidos floemáticos. Todos estos procesos (adquisición, latencia e inoculación) requieren un período para que vector pueda ser virulífero (Federes 2003). Se ha observado que el tiempo de adquisición óptimo debe ser de 12 a 24 horas, latencia de 4 a 12 horas e inoculación de 24 a 48 horas. Estudios han sugerido que este patrón se conserva entre los geminivirus del subgrupo III (Rosell *et al.* 1999)

Se han detectado viriones de geminivirus en el contenido digestivo tanto de *B. tabaci* como de *T. vaporariorum*, indicando que se encuentra en el sistema digestivo de ambas especies. Por el contrario, únicamente se han detectado partículas virales en la saliva y hemolinfa de *B. tabaci*, pero no en *T. vaporariorum*. Esto indica que ambas especies son capaces de ingerir el virus, pero solo en *B. tabaci* los viriones atraviesan la barrera del sistema digestivo y entran a la hemolinfa (o pasa a las glándulas salivares). Sugiriendo que el epitelio digestivo de *T. vaporariorum* no permite el paso de los

viriones desde el sistema digestivo hasta la hemocele. Posiblemente esta especie contiene estructuras anatómicas especializadas que delimitan su movimiento (Rosell *et al.* 1999).

5. Movimiento local y estacional de mosca blanca. Para conocer aspectos cuantitativos del movimiento (entre plantas) local de la mosca blanca, se han realizado mediciones de la tasa de inmigración de los adultos hacia plantas de tomate. Utilizando trampas cilíndricas con orificios que permiten la entrada de luz, se observó que los adultos se desplazan hacia los viales con iluminación. De esta manera las plantas quedan libres de mosca blanca. Después de un tiempo determinado se volvió a realizar la captura de los individuos en las mismas plantas, con el fin de conocer la cantidad de adultos que había migrado en el intervalo de tiempo. Se determinó que el movimiento varía según la ubicación de las plantas en relación al viento y la hora solar. En las partes expuestas al viento, las tasas fueron más altas en comparación con las partes no expuestas. Durante las primeras horas del día (entre 7 y 11 a.m.) se observó mayor movimiento hacia las plantas de tomate en comparación con las otras. Reflejando de manera general, que la mosca se desplaza de planta en planta, infectando a todo el cultivo. Esto tiene relevancia para el diseño de un manejo variable de mosca blanca dentro de un campo, con el uso de franjas de alta frecuencia de aplicaciones de insecticidas o variedades resistentes. La relación entre el movimiento y la hora solar, puede ser usada para determinar las horas de muestreo o aplicaciones de insecticidas. En lo que respecta a los resultados en la exposición al viento, si la tasa de movimiento es alta en las áreas no expuestas al viento, el gradiente decreciente de virosis dentro del campo, únicamente se puede dar si la proporción de los vectores infectivos en la población de mosca blanca es baja. Dado esta condición se pudo dar cierto éxito en el manejo de los virus transmitidos por mosca blanca como un insecto y no necesariamente como un vector. Sin embargo, si la población de migrante de mosca blanca proviene de un campo de rastrojo infectado y la proporción de los vectores infectivos es alta, estas tácticas del manejo integrado no lograrán reducir la incidencia de virosis (Guharany 1994).

Por otra parte, para conocer el movimiento de la mosca blanca durante las diferentes épocas del año, se han realizado capturas quincenales de adultos con trampas amarillas pegajosas. Durante el período de septiembre 1992 hasta mayo de 1993, se compararon las capturas de adultos, en trampas colocadas a 6 pies del suelo y otras entre 4 y 6 pies sobre el suelo. Las capturas realizadas en las primeras trampas fueron significativamente mayores, lo que indican movimientos locales y no migraciones de larga distancia (Guharany 1994).

Para determinar el patrón de movimiento estacional de los adultos de mosca blanca, se realizaron series de capturas en diferentes locaciones. Las capturas de mosca blanca revelaron tres picos altos durante el año, estos ocurrieron en noviembre-diciembre, marzo-abril y agosto-septiembre. Los picos altos de captura coincidieron con los movimientos de maduración fisiológica de las plantas (maleza) resultado en el aumento de movimiento local en busca de nuevos nichos. La coincidencia de estos momentos con la disponibilidad de nuevos brotes de los mismos hospederos o cultivos susceptibles, provee a la mosca blanca la oportunidad de sobrevivir o actuar como plaga. En áreas de riego, el problema se agudiza aún más. En estas áreas además del alto movimiento local, la presencia

continua de hospederos silvestres y cultivados asegura una alta probabilidad de éxito de colonización y reproducción de mosca blanca durante todas las fechas. Esto pone en evidencia la adaptación de este insecto en el agrosistema. Sin embargo, el impacto fundamental de mosca blanca en el sistema de producción agrícola, sigue siendo la transmisión del virus. El conocimiento de los reservorios de virus y la importancia de los hospederos cultivados y silvestres como reservorio de virus, ayudarán a entender la dinámica de los vectores dentro del agrosistema (Guharany 1994).

D. Efectos negativos de la virosis de begomovirus transmitida por mosca blanca a plantaciones de tomate

De acuerdo a investigaciones realizadas con el fin de evaluar la preferencia de la mosca blanca en diferentes cultivos, se probaron 12 especies vegetales en comparación al tomate en cuanto a síntomas y porcentajes de huevos y adultos de *B. tabaci* detectados. Se realizó un recuento de huevos y adultos de *B. tabaci* y síntomas en cada una de las plantas. Los resultados arrojaron que los adultos prefieren al tomate para posarse y alimentarse. Las plantas de tomate y chile fueron las especies (hasta el 100%) más susceptibles al geminivirus transmitido por la mosca blanca, mientras que las especies de sandía, melón okra y tabaco presentaron el problema en menor proporción. Esto demuestra que las plantaciones de tomate están en riesgo potencial ante *B. tabaci* y la transmisión de begomovirus (Calderón 1994).

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

1. Impacto económico. Las enfermedades causadas por geminivirus son mencionadas reiteradamente como la limitante biótica para la producción de tomate en América tropical (Anderson y Poltson 1997). De acuerdo a estudios realizados en Guatemala por FASAGUA, el costo adicional que causan las enfermedades por geminivirus son los siguientes:

Cuadro 6
Costo adicional que causan las enfermedades por geminivirus en el cultivo de tomate en Guatemala (Tomado de FASAGUA 2007)

rubro	ideal (sin virosis)	real (con problemas de virosis)
Rendimiento (cajas/manzana)	1500 - 2500	200 – 1000
Costo de producción (Q./manzana)	40,000 – 50,000	50,000 – 80,000
Costo de Producción (Q./caja)	12-25	40 – 80

Los datos anteriores muestran la importancia de realizar un estudio continuo y de carácter urgente a fin de contrarrestar el problema lo antes posible y ofrecer una sostenibilidad aplicando

medidas que han funcionado en otros países y que ya aplicadas en algunos valles en Guatemala se han obtenido excelentes resultados (FASAGUA 2007).

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

E. Técnicas de diagnóstico para begomovirus

No es posible dar un diagnóstico definitivo con base en la sintomatología, pues como se mencionó anteriormente, ésta varía de acuerdo a la especie de virus, cultivo, edad de la planta al momento de la infección y condiciones ambientales. Por tanto, para el diagnóstico exacto se requiere del uso de pruebas de diagnóstico (Poltson y Anderson 1997). A continuación se describen algunas de las técnicas más utilizadas para la detección de geminivirus.

1. Cuerpos de inclusión. Corresponden a estructuras que aparecen durante la infección por determinados virus. En algunos casos podrían corresponder a factorías o sitios de agregación de viriones. También poseen la propiedad de teñirse con colorantes ácidos o básicos, presentan una localización intracitoplasmática y/o nuclear y su forma de organización guarda relación con el tipo de virus que la produce; siendo por lo tanto de utilidad en el diagnóstico histopatológico, en células exfoliadas y cortes de tejido (Poltson y Anderson). Estos métodos son confiables, prácticos y económicos, pero únicamente puede identificarse el virus a nivel de grupo y pocas veces a nivel específico (Singh y Singh 1995).

Los geminivirus producen grandes inclusiones nucleares, las cuales se tiñen con Azul A. Estas inclusiones, que son características de los geminivirus, pueden observarse mediante un microscopio de luz. El tejido de tomate es relativamente fácil para procesar, y se producen numerosas inclusiones en tejido foliar y flores infectadas diagnóstico (Poltson y Anderson 1997).

2. Pruebas serológicas: ELISA. Se han producido los anticuerpos policlonales y monoclonales de la capa de proteínas de diversos geminivirus que son usados en pruebas de detección y determinación de geminivirus. La selección de anticuerpos puede determinar la especificidad de la prueba y puede ser utilizado para detectar un amplio ámbito de geminivirus y cepas. A pesar de la importancia económica de estos virus, existen pocas empresas comerciales que suministren anticuerpos para la detección de geminivirus por este método (Poltson y Anderson 1997). Entre los inconvenientes de la producción de anticuerpos, pueden mencionarse:

- Inestabilidad de éstos debido a sus propiedades físicas y químicas, que los hacen difícil de purificar en forma estable.
- Los viriones son pobremente inmunogénicos
- las proteínas de la cápside no contienen antígenos que las distinguan entre especies (Wyatt y Brown 1996).

Como todas las pruebas serológicas, esta técnica tiene como limitante la poca información que proporciona acerca de los ácidos nucleicos que se utilizan (Singh y Singh 1995).

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite la multiplicación de copias de moléculas de ADN por la acción de la amplificación enzimática de una secuencia específica ADN blanco (Brown 1995). Para la detección de geminivirus, se necesitan pequeñas cantidades de tejido seco, fresco o congelado y es extremadamente sensible. La especificidad de la prueba puede controlarse mediante la selección de imprimadores o “primers” y las condiciones de la amplificación. Algunas empresas comerciales ofrecen servicios de detección usando estas pruebas diagnóstico (Poltson y Anderson 1997).

En ocasiones la concentración de viroides y algunos virus es menor al límite de detección de técnicas como ELISA e hibridización de ácidos nucleicos (descrita posteriormente), por lo que no puede precisarse la virosis. Este problema se soluciona usando muestras con una secuencia blanco amplificada, como es el caso de patógenos de plantas con conocimientos básicos sobre la estructura de su genoma. Esta amplificación puede realizarse por medio de la reacción en cadena de la polimerasa usando oligonucleótidos (iniciadores) específicos (Singh y Singh 1995).

Este método es altamente eficiente y específico, teóricamente capaz de sintetizar 10^6 copias de una secuencia específica. Luego de la amplificación, pueden analizarse los productos en geles de agarosa. Con esta técnica es posible detectar patógenos presentes en títulos bajos, los cuales no pueden elucidarse con métodos convencionales como ELISA o hibridización. Otras aplicaciones de este método es la identificación de patógenos desconocidos presentes de forma múltiple (infecciones mixtas); detección de patógenos conocidos detectados usualmente con bioensayos; entre otras (Singh y Singh 1995).

Entre los inconvenientes se encuentran el gasto inicial del equipo, capacitación del personal, se deben llevar a cabo buenas prácticas de laboratorio para evitar contaminación de muestra a muestra; es necesario el conocimiento de la secuencia blanco, entre otras. La técnica de PCR puede ser inhibida en extractos de ácidos nucleicos de tejido vegetal o por lo que son necesarias técnicas de purificación para eliminar estos compuestos. (Singh y Singh 1995).

4. Hibridización de ácidos nucleicos. Por medio de esta técnica se detecta el ácido nucleico de los geminivirus pero no su capa proteica. Consiste en separar las dos hebras del ADN doble hélice

(desnaturalización) para posteriormente unir las hebras que sean complementarias (renaturalización). Estos dos pasos se realizan por medio de variaciones de temperatura: desnaturalización por calor y renaturalización al exponerlas a temperaturas bajas (Brown 1995).

5. La hibridización es afectada por varios factores: temperatura, concentración de sal y pH de la reacción. Si hay bajas concentraciones de sal y altas temperaturas la especificidad de la hibridización será alta. Por el contrario, si se realiza a temperaturas bajas hay gran posibilidad que segmentos no complementarios se unan a la sonda. Por lo tanto, las condiciones deben ser cuidadosamente controladas para evitar falsos positivos (Brown 1995).

La especificidad de estas pruebas se logra la selección de las sondas de ADN y las condiciones de hibridización y lavado diagnóstico. Este tipo de prueba es muy útil cuando se quieren estudiar gran número de muestras, pero tienen la limitante de no ofrecer información sobre el tamaño de las bandas del ADN hibridizado (Poltson y Anderson 1997).

F. Métodos de control

Hasta la fecha se han realizado mayor cantidad de investigaciones, tanto en Guatemala como en otros países, sobre todo en lo que respecta a las prácticas de manejo (principalmente dirigidas al control del vector). Estos métodos permiten reducir los efectos del complejo mosca blanca-virus sobre la producción. La resistencia genética, es decir, el uso de variedades resistentes o tolerante, se considera actualmente uno de los componentes más importantes en el programa de manejo integrado de plagas y enfermedades. No obstante, ésta no ha sido adecuadamente explorada en este medio (Mejía 1999).

Dentro de los métodos de control que han sido reportado en Centro América y el Caribe, pueden mencionarse los siguientes:

1. Cultural. Casi en todos los países usan alguna tecnología que incluye fechas de siembra, uso de barreras vivas, altas densidades de siembra, cobertores del suelo, cultivos asociados, cultivos trampa, eliminación de rastrojos, períodos sin cultivo, rotación de cultivos, fertilización adecuada o siembra contra el viento (Mejía y Dardón 1994).

2. Biológico. Su uso se ha aplicado en el cultivo del melón en Guatemala y Honduras, con el uso de parasitoides como *Encarsia* spp., *Eretmocerus* spp., además de depredadores como *Hippodamia* spp., y entomófagos como hongos, bacterias, etc (Mejía y Dardón 1994).

3. Etológico. Se ha implementado en Guatemala y Costa Rica, incluye el uso de trampas amarillas (Mejía y Dardón 1994).

4. Genético. Incluye el uso de materiales tolerantes o resistentes al virus o al insecto. Aunque los mecanismos de resistencia aún no están plenamente determinados se ha logrado obtener material de fíjol tolerante al BGMV. En tomate, se han evaluado en Costa Rica líneas tolerantes al TYLCV (Mejía y Dardón 1994).

5. Períodos libres de hospederos (vedas). Consiste en la eliminación de hospederos del geminivirus, tanto en cultivos como maleza. Las malezas, tales como escobillo (*Malvastrum coromandelianum*), flor amarilla (*Melampodium dicricatum*), mirasol (*Tithonia rotundifolia*), aceitilla (*Bidens pilosa*), cinco negritos (*Lantana camara*) y chinchiguatillo (*Wedelia acapulcensis*), son hospederos de geminivirus y por tanto, son fuentes importantes del inóculo (Mejía 1996).

Al realizar un monitoreo de la mosca blanca en República Dominicana, se encontró una dramática disminución del virus en el período de donde se eliminaban los hospederos del virus. La implementación del período libre de los hospederos, es considerado, en gran parte el responsable de este resultado. La efectividad del período libre de hospederos, en términos de la reducción de la incidencia del virus de TYLCV fue revelado por el monitoreo realizado cada mes. El virus detectado en las muestras de moscas blancas (en cultivos de tomate) disminuyó durante los meses diciembre-enero durante el período libre de hospederos. Por el contrario, aumentó en las áreas en donde no se eliminaron los hospederos durante el mismo período. La implementación de este método es recomendable para reducir la incidencia de virus durante las épocas en donde la incidencia de moscas infectadas es mayor (Salati *et al.* 2002.)

En estos períodos, no se plantan hospederos de begomovirus para lograr que el inóculo presente en los campos disminuya hasta niveles insignificantes. Esto permite a la plantación producir antes que se presente la infección. De esta manera, el agricultor obtiene cosechas de calidad y reduce la necesidad del uso de pesticidas. Estos períodos libres de hospederos se recomiendan aplicarse hasta que no se logre desarrollar otro método efectivo (como variedades resistentes) Con esta técnica se pueden predecir el porcentaje de virus que circula en determinado campo (hospederos y vectores) así como establecer cuáles cultivos serán los más afectados (Salati *et al.* 2002).

G. Estudios previos realizados en Guatemala

Se han realizado varios estudios sobre geminivirus en Guatemala. De acuerdo con Palmieri *et al.* (1999) se encontró un 15% de positividad en las muestras analizadas antes y después de las lluvias. No hay diferencia significativa entre la distribución de muestras positivas durante esos períodos (Palmieri *et al.* 1999).

III. JUSTIFICACIÓN

La mosca blanca *Bemisia tabaci* es el principal vector de enfermedades producidas por geminivirus. Éstos pueden dejar pérdidas de 70%-90% o hasta del 100% cuando la infección se da en etapas tempranas del desarrollo de la planta. Estas enfermedades no sólo ocurren en tomate, sino también en otros hospederos como melón, chile, etc, también cultivados en Guatemala. Dado que la economía de este país se basa predominantemente en el área agrícola, pérdida de tal magnitud puede llevar a una crisis económica severa.

Dada la alta incidencia de estos virus, es importante hacer estudios para establecer patrones de la enfermedad en las diferentes épocas del año y así entender las interacciones virus-vector-hospedero. El conocimiento sobre *B. tabaci* tiene como objetivo final, reducir las pérdidas en los cultivos, debidas al daño ocasionado por la alimentación directa y la transmisión de virus. Esto ayudará a desarrollar estrategias más efectivas para control de la enfermedad e implementar medidas preventivas (vedas) y no curativas como ha sido hasta el momento. Una vez que la planta adquiere la enfermedad, no hay cura por lo que se enfatiza en su prevención.

El resultado a largo plazo, es el mejoramiento en el manejo de las enfermedades provocadas por geminivirus; reducir las pérdidas económicas en el cultivo de tomate; obtener una producción más efectiva tanto en costo como en calidad; así como protección del ambiente y la salud ante el uso excesivo de los agroquímicos.

Al minimizar los costos por virosis, puede ser considerado un cultivo para exportación (especialmente en los mercados de México y Estados Unidos) Se estima que al exportar tomate y chile pimiento (ambos hospederos de geminivirus) se podrían generar alrededor de 20 a 30 millones de dólares en divisas y 20 mil empleos directos (en un plazo de 5 años) . El tomate y chile guatemalteco además de tener el acceso a Estados Unidos, el mayor mercado se exportaría a Canadá, México y la región Centroamericana.

IV. OBJETIVOS

A. Generales

1. Monitorear la incidencia de begomovirus general y específico en mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en cinco valles tomateros de Guatemala para predecir períodos adecuados para la siembra de este cultivo.
2. Sugerir épocas de veda como método preventivo a la transmisión de begomovirus.

B. Específicos

1. Monitorear la incidencia de begomovirus general en mosca blanca (*B. tabaci* y *T. vaporarorium*) en Salamá, Laguna de Retana, Área central, Esquipulas y Santa Rosa durante un año, utilizando PCR con iniciadores degenerados.
2. Determinar la proporción de *B. tabaci* en relación con otras especies de mosca blanca para comparar con el porcentaje de virosis de begomovirus general.
3. Estimar la incidencia de los begomovirus más frecuentes en Guatemala (*Pepper huasteco yellow vein virus*, *Pepper golden mosaic virus*, *Tomato mosaic havana virus* y *Tomato severe leaf curl virus*) en las muestras positivas para begomovirus general, utilizando iniciadores específicos.
4. Seleccionar posibles épocas de veda y de siembra de tomate, de acuerdo a los porcentajes de begomovirus (general y específico) circulante.
5. Establecer patrones de bandas generadas por PCR de cada virus específico, mediante la técnica de SSCP.

V. HIPÓTESIS

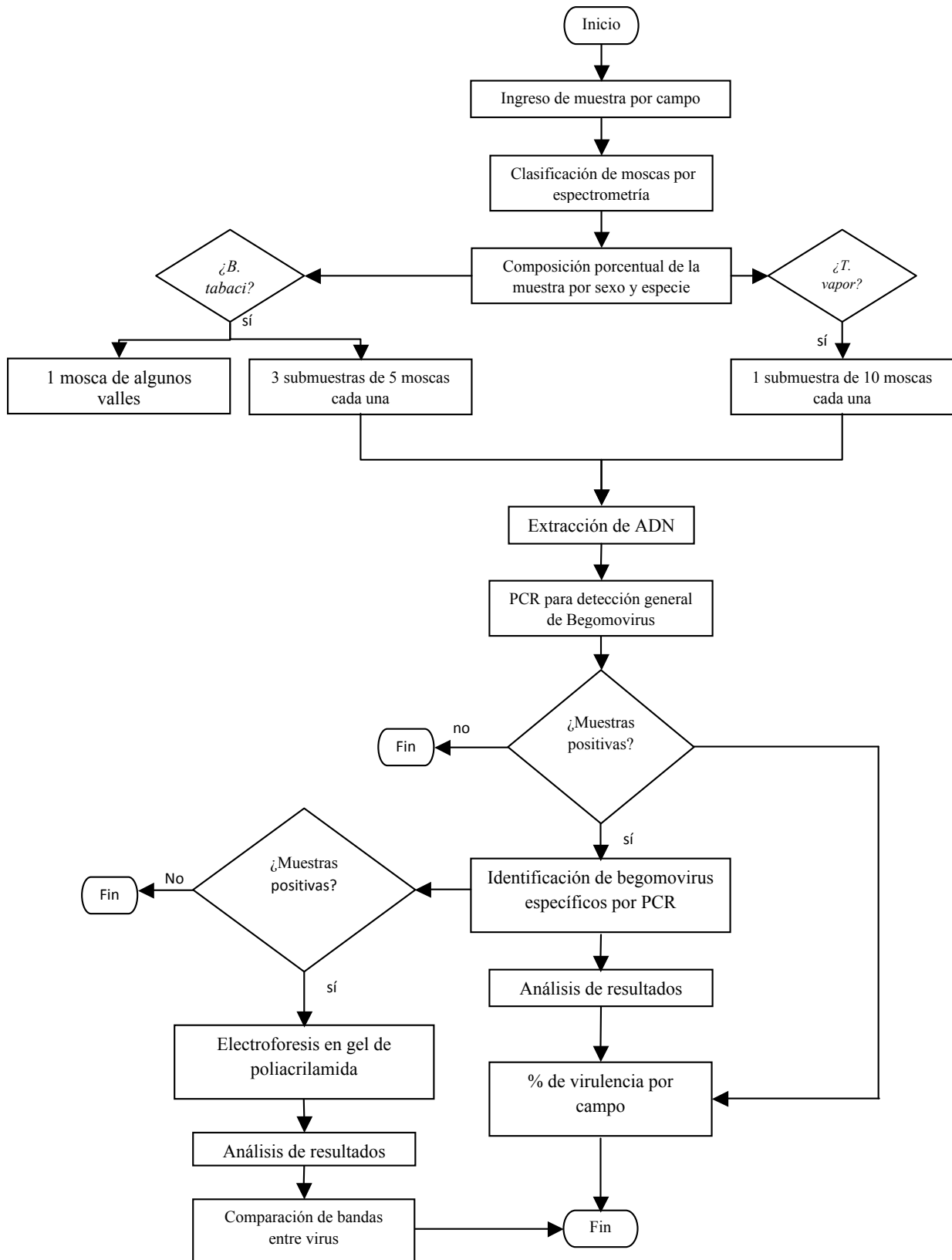
Se proponen las siguientes hipótesis:

- A. Es posible predecir el porcentaje de virus circulante en determinado campo de cultivo, para seleccionar una época de veda como parte de un programa de manejo integrado.
- B. La incidencia de los begomovirus más frecuentes en Guatemala (*Pepper huasteco yellow vein virus*, *Pepper golden mosaic virus*, *Tomato mosaic Havana virus* y *Tomato severe leaf curl virus*) transmitidos por *B. tabaci* difiere durante las diferentes épocas del año.
- C. *Pepper huasteco yellow vein virus* es el begomovirus predominante en los diferentes campos tomateros, durante las diferentes épocas del año.
- D. Cada virus específico presenta un patrón de bandas característico que lo distingue de los otros.

VI. MATERIALES Y MÉTODO

A. Esquema general de la metodología

Figura 5
Diagrama de flujo del método que se realizó



B. Materiales

1. Reactivos

Reactivo	Marca	Especificaciones
Tris-HCl	Sigma	Grado reactivo
Nodidet p-40	Sigma	Grado reactivo
EDTA	Sigma	Grado reactivo
Proteinasa K	Sigma	Grado biología molecular
Deoxinucleótidos trifosfatados	Promega	Grado biología molecular
Solución amortiguadora 10x para PCR	Promega	Grado biología molecular
Taq ADN polimerasa	Promega	Grado biología molecular
Ácido bórico	J. T. Baker	Grado reactivo
Agarosa	Merck	Grado biología molecular
Marcador de masa molecular de 1Kb	Promega y Eurogentec	Grado biología molecular
Formamida	Merck	Grado reactivo
Azul de bromofenol	Merck	Grado reactivo
Xilen cianol	Merck	Grado reactivo
Hidróxido de sodio	Merck	Grado biología molecular
Acrilamida	Merck	Grado biología molecular
Bisacrilamida	Merck	Reactivo pureza electroforesis
Nitrato de plata	Merck	Grado reactivo
Ácido acético	Merck	Grado reactivo
Carbonato de sodio	Merck	Grado reactivo
TEMED	Merck	Grado reactivo
Persulfato de amonio	Sigma	Grado reactivo
Tiosulfato de sodio	J. T. Baker	Grado reactivo
Aceite mineral	Sigma	Grado biología molecular
Bromuro de etidio	Fisher Biotech	Reactivo pureza electroforesis
Formaldehído al 37%	Merck	Grado reactivo
Imprimadores (tanto generales como específicos)	Invitrogen	Ver secuencias en apéndice B: Programas de PCR y secuencias de imprimadores

2. Equipo

Equipo	Marca	Especificaciones
Refrigerador		
Termociclador	MJ Reserch, Inc.	Modelo PTC-100
Fuente de poder	Sigma Aldrich Techware	PS 251-1
Cámara de electroforesis horizontal		Mod. E 0638; 259 V DC; límites de operación: 250V DC, 15W, 60mA, 50°C
Cámara de electroforesis vertical	Bio-Rad Mini Protean III	
Bloque térmico	Thermolyne	
Micropipetas	Eppendorf	2, 10, 200, 1000µL
Balanza analítica	Mettler	Modelo AE 163
Estereoscopio	Heerburg	Modelo M3Z
Transluminador UV		

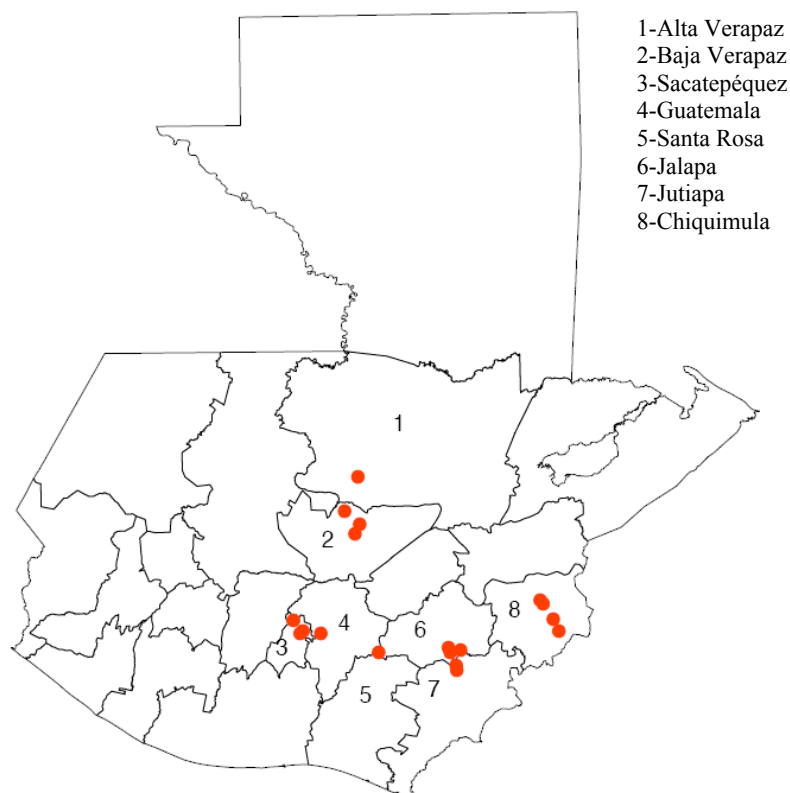
3. Otros materiales

- Probetas 10, 50 y 100mL
- Beakers 59, 100, 250 y 500 mL
- Agitadores magnéticos
- Papel encerado
- Tubos *ependorf* de 0.5 y 1.5 mL
- Cajas petri
- Bulbos para pipetas
- Filtros *nalgene*
- Gradillas
- Puntas para micropipetas
- Parafilm
- Espátulas
- pinzas
- Frascos de vidrio
- Pipetas pasteur

C. Método

1. Colecta de las muestras. Las muestras de mosca blanca fueron colectadas desde febrero 2006 a enero 2007. Los lugares de muestreo fueron plantaciones de tomate en Salamá, Baja Verapaz, Laguna Retana, Área Central (Villa Nueva y Amatitlán), Esquipulas y Santa Rosa. Se procuró tomar moscas en cinco diferentes puntos: este, oeste, norte, sur y centro, aproximadamente 100 individuos. Los puntos muestreados fueron los que se indican a continuación:

Figura 6
Lugares muestreados



Cuadro 7
Coordenadas de los puntos muestreados

Valle	Punto muestreado	Latitud	longitud	Altitud
Salamá	Norte	15°07'24''	90°19'22''	975
	Sur	15°05'15''	90°18'35''	987
	Este	15°03'44''	90°16'38''	1055
	Oeste	15°06'51''	90°20'43''	971
Laguna de Retana	Sur	14°24'04''	89°50'11''	1053
	Centro	14°24'35''	89°50'23''	1054
	Este	14°25'05''	89°49'18''	1077
	Norte	14°25'34''	89°50'03''	1082
	Oeste	14°25'38''	89°51'20''	1094
Área central	Finca. San Jorge	14°29'43''	90°35'01''	1225
	Finca El Puente (Amatitlán)	14°31'37''	90°33'47''	1213
	ENCA	14°32'26''	90°36'35''	1405
	Finca Fernando González (Bárcenas)	14°32'50''	90°37'41''	1535
Esquipulas	Rodeo	14°39'40''	89°16'53''	972
	Cuevitas	14°37'17''	89°18'16''	937
	Olopitas	14°36'00''	89°18'06''	927
	Valle Dolores	14°35'59''	89°20'23''	945
Santa Rosa	Norte	14°30'01''	90°10'40''	1422

Se buscaron moscas blancas en estado adulto en el envés de las hojas y se succionaron con un aspirador construido con una boquilla unida a un tubo que contenía etanol 80%, en donde se preservaron hasta ser llevadas al laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle.

H. Identificación. Se identificaron según especie y sexo. Se determinó la especie de mosca blanca según Palmieri *et al.*, utilizando como criterio principal la colocación de los omatidios en la cabeza (figura 7). El sexo se determinó utilizando como indicador el segmento final del abdomen (figura 8).

Figura 7
Disposición de omatidios de las especies de más comunes de mosca blanca (Tomado de Palmieri *et al.* 1999)

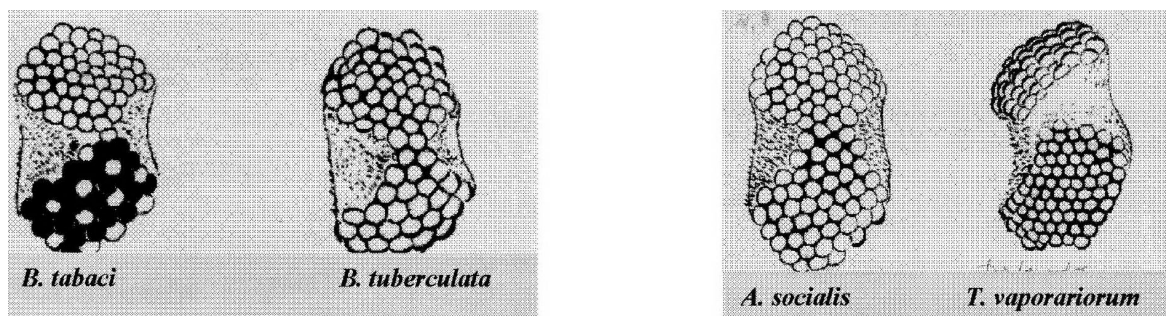
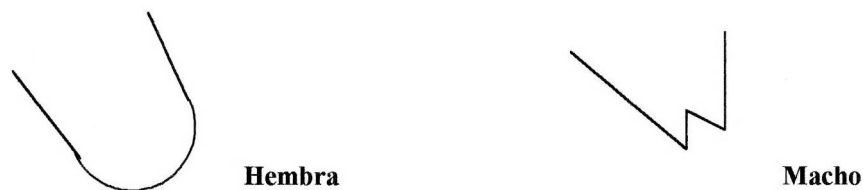


Figura 8
 Segmento final del abdomen de la mosca blanca para diferenciar sexos (Tomado de Palmieri *et al.* 1999)



I. Extracción de ADN. Se utilizaron hembras *B. tabaci* y *T. vaporarorium*. Se decidió trabajar con ambas especies, ya que la primera es el vector principal y la segunda como un indicador de la presencia de virus en el campo.

Con el fin de obtener suficiente ADN se hicieron grupos de 1 a 5 moscas para *B. tabaci* y 1 a 10 para de *T. vaporarorium* (mayor número de estos individuos con el fin de poder detectar el virus). Cada grupo fue considerado como una muestra.

A cada muestra se agregaron 10 μ L de buffer de lisis (ver apéndice). Se maceró con un pistilo de plástico, sobre una caja petri forrada con papel aluminio y parafilm, hasta obtener una consistencia uniforme. Se agregaron otros 100 μ L de buffer de lisis (o 20 μ L por mosca), se calentaron por aprox. 15 minutos a 95°C y se almacenaron a -20°C. Se extrajo ADN (de la misma forma) de moscas individuales para determinar si una sola estaba infectada con varios virus y para establecer patrones de bandas por medio de SSCP de los virus que transmiten.

J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de begomovirus general. De cada campo se realizaron un total de 4 pruebas de PCR, por punto de colecta: 3 en *Bemisia tabaci* y 1 en *Trialeurodes vaporariorum*. Si no se contaban con suficientes adultos de *B. tabaci* para correr las tres pruebas, se trabajó las restantes con adultos de *T. vaporariorum*. Además se analizó una mosca individual por cada valle.

Cada PCR consistió de 20.5 μ L de mezcla de reacción (descrita en el apéndice A: soluciones utilizadas) y 4.5 μ L de ADN. En cada corrida, se incluyó marcador de masa molecular de 1 kb y controles tanto positivos como negativos. El programa utilizado para la ampliación se describe en el apéndice B: Programas de PCR y secuencias de imprimadores). Los productos de PCR se almacenaron a 4°C hasta su análisis posterior. Se consideró positivo aquellas muestras que luego de la electroforesis presentaran una banda de 544 pb.

K. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar el begomovirus. Se seleccionaron algunas de las muestras positivas para begomovirus general (incluyendo moscas individuales) y se corrieron 4 reacciones de PCR para identificar el virus.

Cada PCR consistió de 20 μ L de mezcla de reacción (ver apéndice A: soluciones utilizadas) y 5 μ L de ADN, las otras condiciones se describen en el apéndice A. Los pares de imprimadores utilizados fueron propuestos por Nakhla *et al.* (ver secuencias en apéndice B). Los virus específicos que se identificaron son los más frecuentes en Guatemala (*Pepper huasteco yellow vein virus*, *Pepper golden mosaic begomovirus*, *Havana golden mosaic begomovirus* y *Severe leaf yellow mosaic virus*). Se consideró positivo aquellas muestras que luego de la electroforesis presentaran una banda de 700 pb para *Pepper huasteco yellow vein virus* y una de 400 pb para los otros tres virus.

L. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. Para visualizar el resultado obtenido con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, se migró el producto de PCR, a través de un gel de agarosa 1% en buffer TAE 1x (ver apéndice A).

Para ello, se cargó en una cámara de electroforesis horizontal 6.5 μ L de producto de PCR con 1 μ L de buffer de montaje, incluyendo los controles de PCR y marcador de masa molecular de 1 kb. El gel se corrió entre 80 y 85 volts usando como solución amortiguadora TAE 1X. Se tiñó con bromuro de etidio por 5 minutos y destiñó con agua por otros 5 minutos. Se expuso a luz UV para visualizar las bandas y se fotografió. Este procedimiento se realizó tanto para los productos de PCR general como específico.

M. Análisis del patrón de bandas por medio de SSCP. Se analizó el producto de PCR de muestras (grupos) positivas para todos los virus específicos y negativo para los 4, pero positivas para el general; moscas individuales en que se detectó únicamente 1 de los 4 virus específicos (utilizando en todas los iniciadores específicos). Además se corrieron algunas muestras que dieron una banda intensa con los imprimadores degenerados.

La preparación del gel de poliacrilamida se describe a continuación:

a. Preparación del gel. Se preparó un un gel de poliacrilamida al 30% (ver apéndice A) y dejó polimerizar por aproximadamente una hora.

b. Cargado del gel. Se mezclaron en un tubo 2 μ L de producto de PCR y 9 μ L de buffer desnaturizante de carga (ver Apéndice A) y calentaron a 95°C por tres minutos e inmediatamente colocados en hielo durante 5 minutos. Se colocaron 2 μ L de esta mezcla en cada pozo del gel de poliacrilamida. En cada corrida se incluyó marcador de masa molecular de 1kb.

c. Corrida del gel. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje máximo a 25 miliamperios y 4°C hasta que ambas bandas de colorante (azul y naranja) se salieron (aproximadamente 5h). Se empleó como buffer de cámara TBE 0.5X (ver apéndice A).

d. Tinción de plata. Se removieron los geles de las placas de vidrio y se colocaron en un recipiente con 200 mL de ácido acético 10% (ver apéndice A). El gel se lavó 4 veces con 250 mL de agua destilada por dos minutos con agitación constante. Se transfirió a 150 mL de solución colorante de nitrato de plata (ver apéndice A) y dejó por 30 minutos. Se escurrió y lavó con agua destilada por aproximadamente 20 minutos, se agregaron 250 mL de solución de carbonato de sodio (ver apéndice A). Esta reacción se detuvo con 200mL de ácido acético 10%.

Los geles se colocaron sobre un papel filtro, luego se cubrieron con plástico y dejaron secar en un horno.

N. Análisis de los resultados. Los datos se agruparon de acuerdo a la época donde se realizaron las colectas y presencia/ausencia del virus, obteniendo en cada una el porcentaje de incidencia de begomovirus (tanto general como específico). Luego se graficaron los datos tomando como porcentaje de virulencia de cada valle, a la media del porcentaje de virulencia de los campos que componen dicho valle, para cada uno de los meses. El porcentaje de cada especie de mosca se analizó de la misma manera. Se hizo una correlación entre la proporción de mosca *B. tabaci* y el porcentaje de virulencia de ésta con el programa Microsoft Excel.

Se determinó mediante la prueba no paramétrica de *Kruskal Wallis*, si existía diferencia estadística significativa del porcentaje de cada virus (general y específico) encontrado en cada región, en caso que la hubiera, cuál virus fue el más abundante. La ecuación utilizada para calcular el valor F fue:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \left(\sum \frac{(T_g)^2}{n_g} \right) - 3(N+1)$$

Ecuación 1

De donde:

N: número total de datos analizados

Tg: suma de rangos

ng: número de datos de cada columna

(Freund y Wilson 1997)

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Porcentaje de hembras de mosca blanca

En el cuadro 10 (Apéndice C) y figuras 14 a 18 (Apéndice C) se muestran los porcentajes de las especies encontradas en cada campo muestreado. Idealmente, se trató de capturar 100 individuos por valle, pero en ocasiones no se encontró esa cantidad, por lo que se trabajó con los especímenes colectados.

Debido que *B. tabaci* es el principal vector de este virus, se hizo mayor énfasis en su análisis. Sin embargo, se trató a *T. vaporarorium* como otra especie importante, al considerar la abundancia respecto a las otras moscas blancas y a su capacidad de actuar como reservorio, aunque no transmite el virus. Se decidió tomar en cuenta únicamente hembras (ambas especies), ya que en éstas es más fácil detectarlo.

De modo general, se observó que *B. tabaci* y *T. vaporarorium* predominan en todos los meses y campos muestreados. Otras especies identificadas fueron *T. abutiloneus*, *B. tuberculata* y sin identificar (con un omatidio rojo y otro negro). Éstas aunque no transmiten begomovirus, dispersan otros virus (como potyvirus) o causan daño mecánico que igualmente alteran la producción de los cultivos.

En lo que concierne al porcentaje de individuos (*B. tabaci*) durante las diferentes épocas del año, se determinó una tendencia similar en todos los valles como se muestra en la figura 9:

Figura 9

Porcentaje de hembras *B. tabaci* colectadas en los cinco valles tomateros durante febrero 2006 a enero 2007

¡Error!Vínculo no válido.

El muestreo inició con niveles altos de *B. tabaci*. Durante la época seca (marzo a mayo) y principio de las lluvias (junio y julio) descendió a los porcentajes más bajos (22% en Salamá, 0% en Laguna de Retana, 3% en el área central y 38% en Santa Rosa). Exceptuando Esquipulas, donde el período de baja incidencia (3%) se prolongó desde febrero a septiembre (con la salvedad de marzo que alcanzó 41%). A partir del establecimiento de las lluvias, los valores variaron, pero generalmente fueron mayores que en época seca (superiores a 50%) y se mantuvieron estables en los meses posteriores a las lluvias, con tendencia a disminuir.

Otra similitud en todos los valles, es que cuando *B. tabaci* o *T. vaporarorium* presenta alta abundancia, la otra disminuye. La aparición de otras especies en los últimos meses del año es otra característica en común (debida posiblemente a factores climáticos). Todos estos comportamientos ya han sido descritos anteriormente (Palmieri *et al.* 1999), por lo que se infiere que el patrón de comportamiento se repite anualmente, pero hay que realizar más estudios para confirmarlo.

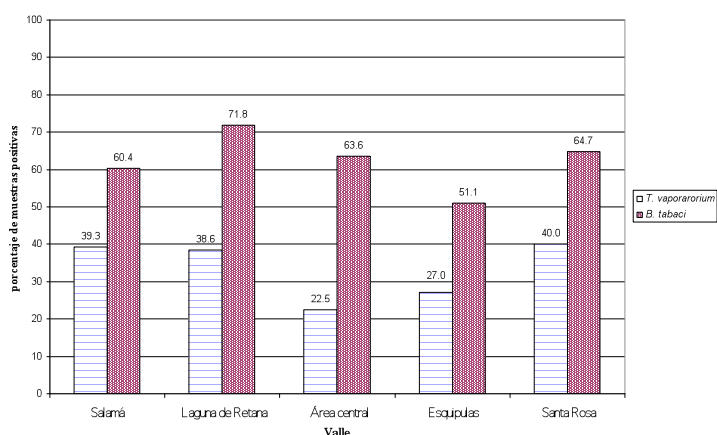
B. Incidencia de virosis general

Para determinar la presencia de geminivirus general, se usaron los imprimadores degenerados 514 y 1048. Éstos amplifican un segmento del anillo A que contiene parte de dos genes (CP y Rep) que codifican una proteína de cápside, común para todos los begomovirus. Aunque la secuencia de los fragmentos difiere de acuerdo a la especie, el tamaño esperado era 544 pb. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

De las 545 muestras analizadas 341 fueron positivas, lo que equivale al 62.6% del total. En los cuadros 11 y 12 (ver apéndice C) y figura 10 se aprecia mayor porcentaje de muestras positivas de *B. tabaci* con respecto a *T. vaporarorium*, lo que sugiere que la primera puede adquirir el virus más fácilmente.

Figura 10

Porcentaje de muestras positivas para begomovirus general detectadas en los cinco valles muestreados



Según datos recolectados por la Universidad del Valle en el 2003, se ha incrementado la incidencia de begomovirus. De acuerdo con Palmieri *et. al* (1999), se obtuvo alrededor del 15% de las muestras positivas, mientras que en este estudio el promedio fue mayor al 50% (Salamá 60.4%, Laguna de Retana 71.8%, Área central 63.6%, Esquipulas 51.1% y Santa Rosa 64.7%). Aunque no hay datos reportados para *T. vaporarorium*, se obtuvo más muestras positivas con relación a *B. tabaci* del estudio anterior.

Esto puede deberse a que los agricultores al notar la severidad de los daños, siembran en otros lugares, transportando el virus y por ende favoreciendo su proliferación; al uso del tomate y chile como cultivos alternos (mayor fuente de inóculo) o mejor adaptación del virus para proliferar en los hospederos o resistir al medio.

La distribución de muestras positivas de *B. tabaci*, según el mes en el que se hicieron las colectas de mosca blanca se muestran en las figura 11, 19 a 23 (ver apéndice C)

Figura 11

Incidencia de virosis detectada en *B. tabaci* recolectadas en los diferentes valles tomateros durante febrero 2006 a enero 2007

¡Error!Vínculo no válido.

Se observó (con excepción de Esquipulas) que a partir de abril hasta aproximadamente julio la incidencia de virosis disminuye hasta los niveles más bajos. En Salamá y Laguna Retana, la menor virulencia ocurre durante mayo a julio (27% y 0% en julio, respectivamente); área central y Santa Rosa en mayo (0% y 22% respectivamente); Esquipulas desde agosto hasta septiembre (0% en ambos meses).

Por el contrario, los meses con mayor incidencia varían según el lugar. Hay dos incrementos, uno entre final y principios de año y el otro posterior a los meses con menos virulencia. Posiblemente, después que caen las primeras lluvias (mayo), la mayoría de los adultos *B. tabaci* (ver cuadro 10 en apéndice C) muere, por lo que se detiene la transmisión. Mientras la incidencia de virosis disminuye, reservorios como maleza u otros cultivos mantienen el virus en el campo, hasta que nuevas generaciones de moscas lo adquieren y dispersan (debido a ello se observa un aumento drástico luego de los niveles más bajos de infección).

Por otro lado, en *T. vaporarorium*, el comportamiento fue similar (ver figura 13). La incidencia de virosis en esta especie disminuyó en abril a mayo hasta porcentajes cercanos al 0%, luego subió hasta casi el 100% durante junio a septiembre; de octubre a diciembre la virosis bajó desde valores aproximadamente 80% a 25% y tendió a aumentar en los meses posteriores. Puede notarse que en los meses de baja virulencia de *B. tabaci*, se detectaron muestras positivas de *T. vaporarorium*, lo que sugiere que en el campo siempre hay virus circulante. El estudio de esta especie fue importante para determinar si era indicador de la cantidad de virus circulante en los campos.

Al correlacionar los resultados de virosis y porcentaje de hembras *B. tabaci* circulante, no se encontró relación lineal entre ambas variables. El cuadro que se describe a continuación muestra los índices de correlación (calculados con el programa Microsoft Excel):

Cuadro 8
Coeficientes de correlación entre el porcentaje de hembras *B. tabaci* y la virosis presente, calculado para cada lugar muestreado

Lugar	coeficiente correlación
Salamá	-0.075
Laguna de Retana	0.55
Área central	0.25
Esquipulas	0.15
Santa Rosa	-0.27

Este índice de correlación de Sperman indica el grado de dependencia entre variables (si una aumenta, la otra también en la misma proporción; si los valores son negativos esta relación es inversa). La escala de este valor oscila entre -1 y $+1$, en medio se encuentra el valor 0, indicando que no existe asociación lineal entre las variables a estudio (Fernández y Díaz 2001). En las muestras analizadas es

cercano a 0.5, lo cual no revela necesariamente que no exista correlación ya que las variables pueden presentar una relación no lineal.

La diferencia de resultados (especialmente positivos y negativos) entre los diferentes valles, puede deberse a otras variables, como prácticas culturales de los agricultores, localización geográfica y factores climáticos del lugar, uso de productos químicos, otros cultivos, malezas, etc. Por ello, es necesario hacer más estudios enfocado a estas variables para establecer posibles interacciones con ellas.

Por otro lado, al comparar la incidencia de muestras positivas en cinco lugares muestreados, se notó que durante las diversas épocas del año presentan diferentes porcentajes, pero de manera general se tienen el mismo comportamiento. Para confirmar la hipótesis anterior, se analizaron los datos mediante la prueba no paramétrica de *Kuskal Wallis*. Se decidió aplicar este método, pues se desconocía si la distribución de los datos era normal y si las poblaciones tienen la misma varianza. Este método es el equivalente no paramétrico de ANOVA. Consiste en ordenar los datos, asignándoles una posición o rango 1, hasta la posición o rango n. Si las poblaciones fueran seleccionadas de poblaciones idénticas, la suma de los rangos correspondientes a cada muestra, debería ser aproximadamente a los tamaños de las muestras n_1 y n_2 . Los valores experimentales de H son comparados con los críticos de χ^2 (chi cuadrado) rechazando o aceptando la hipótesis nula de acuerdo al valor de H (Freund y Wilson 1997).

Al realizar este análisis, se encontró que con nivel de significancia $\alpha=0.05$, la H experimental es 4.89 con 4 grados de libertad y χ^2 crítica 9.45 con 4 grados de libertad, por lo que se aceptó la hipótesis nula. Es decir, estadísticamente con $\alpha=0.05$ la proporción entre muestras positivas y negativas de begomovirus general en todos los lugares muestreados son parecidas.

C. Períodos de veda

La importancia del monitoreo de la virulencia es para identificar períodos de mayor incidencia de begomovirus. La razón de prolongar las vedas por dos meses, es para eliminar cualquier fuente de inóculo del virus, así las generaciones posteriores de mosca blanca estén libres de éste.

Debido que el tomate es un cultivo de crecimiento rápido, supera el tiempo que tarda la mosca en volver a infectarse (ya que la cantidad de virus que generalmente se encuentra en la maleza es bajo). En lo que la mosca recupera su infectividad (ésta no puede transmitir el virus inmediatamente porque trasmite el virus de forma persistente) la plantación de tomate ya ha producido fruto y si lo infecta ya no daña la producción. Por tal razón, se sugiere las vedas al cultivo de tomate como método alternativo para el control de esta plaga.

Al establecerse en cada valle los meses con mayor incidencia, los períodos de veda sugeridos (2 meses) considerando la localización geográfica de cada uno, son: Salamá julio-agosto, Laguna de

Retana agosto-septiembre, área central febrero-marzo, Esquipulas octubre-noviembre y Santa Rosa diciembre-enero, según se observa en la figura 12.

Figura 12
Períodos de veda y siembra sugeridos para los lugares muestreados de acuerdo la incidencia de virosis

¡Error!Vínculo no válido.

Las áreas sombreadas son los meses sugeridos para veda; el resto para siembra. Este lapso se seleccionó con base en la mayor incidencia de begomovirus.

Los períodos libres de hospederos o vedas deben llevarse a cabo previo a la siembra del tomate para eliminar cualquier posible inóculo de virus. Se recomienda llevar a cabo vedas no simultáneas, establecidas por regiones. Si se hiciera una veda general, en ese lapso no se produciría tomate, provocando que su precio se eleve excesivamente. El propósito es mantener la siembra durante todo el año, limitándola en ciertos lugares, pero cosechando en otros. Durante la veda, para que el agricultor no tenga pérdidas económicas por falta de producción de tomate, se aconseja cultivar otros productos alternos (no hospederos de geminivirus) como maíz y cebolla. Además, se deben eliminar todos los posibles hospederos (malezas o rastrojos) para impedir que nuevas generaciones de moscas blancas se infecten y transmitan el virus durante la veda.

En los períodos de baja incidencia de begomovirus en mosca blanca, no excluye la posibilidad de infección en las plantas, pues éstas actúan como reservorios (en ocasiones asintomáticas). Por ello, se aconseja monitorear el virus mediante PCR directamente en los hospederos (tanto primarios como secundarios), así conjuntamente proponer vedas que podrían ser más efectivas.

Las vedas deberán aplicarse como método complementario a los usados hasta el momento. Esta medida es parte de un programa de manejo integrado, que como si bien se indica, por si misma no es efectiva. Por ello, es necesario conciencia a los agricultores, haciéndoles saber los beneficios que obtendrán al valerse de esta técnica. Actualmente existen organizaciones (FASAGUA) que están interesadas en hacer trabajos en conjunto, lo cual beneficia enormemente a la intención de implementar otras medidas de control.

D. Incidencia de virus específicos

De acuerdo a la persistencia del virus en el vector, se identificaron los cuatro begomovirus más frecuentes en Guatemala. Esto es importante debido a la posibilidad del surgimiento de otra especie más virulenta (como TYLCV) o una modificación genética de un virus que lo haga más peligroso (especialmente en infecciones mixtas).

De las pruebas con las moscas individuales, se esperaba establecer si una mosca era capaz de portar más de un virus. De las 24 moscas analizadas en 6 se detectó un solo tipo de virus (25%) en el

resto se detectaron diferentes combinaciones. Esto indica que una misma mosca es capaz de infectar una planta con más de un virus, dando infecciones mixtas.

Sin embargo, es posible que una mosca porte los 4 virus, pero la planta adquiera únicamente uno (depende de sus estrategias inmunes para combatirlos). Para determinar cuál es el begomovirus predominante en los cultivos, es necesario hacer pruebas directamente en los hospederos. Asimismo, en este estudio se detectó cualitativamente la presencia de virus (positivo o negativo). Para comprobar si la cantidad de inóculo de cada begomovirus que transporta el vector es igual, se necesitan profundizar con métodos cuantitativos (como PCR *real time*) y determinarlo de manera más certera.

En lo que respecta a los resultados según al análisis estadístico realizado, la distribución por valle de las 4 especies de begomovirus (ver cuadro 9) detectadas en mosca blanca es igual. Se aceptó la hipótesis nula pues, el valor de H experimental 7.57, 5.66, 4.60, 3.60 y 2.61 y χ^2 crítico 7.815 con 3 grados de libertad y $\alpha=0.05$, para Salamá, Área central, Laguna de Retana, Esquipulas y Santa Rosa respectivamente). Al establecer que la distribución de los 4 virus es igual, automáticamente se descartó la hipótesis que *Pepper huasteco yellow vein virus* es el mayoritario.

Posiblemente *Tomato mosaic havana virus* y *Tomato severe leaf curl virus* han adquirido mayor habilidad para evadir los sistemas de defensa de las plantas, haciéndose más virulentos o se han podido dispersar mejor.

Los resultados muestran que en el campo circulan las cuatro especies de begomovirus analizadas, dando posibilidad a infecciones mixtas en una misma planta. Probablemente el aspecto más importante estas infecciones es la alteración de los síntomas y aumento en la tasa de replicación del virus. En éstas, el tipo de interacciones entre los virus co-infectantes pueden causar sinergismo (haciendo más severos los síntomas que en una infección pura o viceversa). Durante estas interacciones puede haber eventos de recombinación y complementación dando como resultado la posibilidad de nuevos virus (Méndez *et al.* 2003).

En el caso de *Pepper huasteco virus* y *Pepper golden mosaic virus*, la alteración de los síntomas depende del hospedero ya que en infecciones mixtas de estos virus, se ha observado un efecto antagónico en chile y sinergismo en tabaco. El antagonismo es probablemente una ventaja de las infecciones mixtas, pues *Pepper huasteco virus* reduce la severidad con que infecta *Pepper golden mosaic virus* (Méndez *et al.* 2003). En tomate, no se ha reportado el efecto que tiene la combinación de estos virus. Debido que en Guatemala, tanto *Pepper huasteco virus* y *Pepper golden mosaic virus* circulan en los campos, es necesario establecer las interacciones de éstos en el cultivo de tomate, para determinar de qué tipo es. De esta manera sugerir soluciones al problema.

Por otro lado, en el caso de Santa Rosa, hubo muestras que no amplificaron con los imprimadores específicos, pero sí con los generales. Por lo que se enviarán a secuenciar para establecer si se trata de una nueva especie o es una cepa de las existentes en Guatemala que no es amplificadas con

los imprimadores específicos. Por el momento se realizó un análisis preliminar por polimorfismo en la conformación de filamentos de ADN monocatenario (SSCP). Los productos de PCR con los iniciadores degenerados se corrieron en un gel de poliacrilamida para comparar si los patrones de bandas coincidían con otras muestras identificadas, como se indica en la siguiente sección.

Es importante destacar en que el estudio se realizó la identificación de virus por medio de PCR. Ésta técnica aunque es sumamente sensible, no permite correr mayor número de muestras simultáneas. Se corrieron 756 muestras en la identificación. En otras técnicas como hibridización, estas muestras pueden correr en grupos, lo que disminuye el tiempo de análisis, además de facilitarlos.

E. Patrones de bandas característicos de cada virus mediante SSCP del producto de PCR usando imprimadores degenerados

La técnica SSPC (*single strand conformation polymorphism*) permite detectar mutaciones con base en la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida debido a la estructura alterada por agentes desnaturizantes. La movilidad electroforética de los productos de PCR (simple hebra) depende de su estructura secundaria. Por lo que si éstos contienen diferentes secuencias (como inserciones o eliminaciones) tendrán diferentes movilidades (Orozco 1999). Esta técnica es rápida y sencilla (comparada con secuenciación) que puede ser útil para hacer seleccionar posibles muestras a secuenciar.

Se analizaron mediante SSCP productos de PCR usando imprimadores degenerados y específicos. En el caso de los degenerados se corrieron: 1) moscas individuales que dieran únicamente positivo para un virus específico; 2) muestras positivas para todos los virus) y 3) aquellas en donde hubo amplificación con los imprimadores generales, pero no en los específicos. Esto se realizó para tratar de hacer una identificación preliminar de las muestras no identificadas con los cebadores específicos. Además se seleccionaron algunas de las muestras que hubieran dado una banda intensa con al amplificar con los iniciadores específicos (a modo de determinar si existe polimorfismo entre miembros de una misma especie).

No fue posible establecer un patrón de bandas característico de cada virus (al analizar el producto de PCR utilizado los iniciadores degenerados) porque se obtuvieron varios Rf comunes y no entre sí (ver figuras 32 y 33). Para obtener datos más concretos, se recomienda aumentar en número de muestras corridas, de esta manera establecer un conjunto de posibles patrones para un virus específico.

Por otro lado, como pude observarse en las figuras 34 y 35 aparecen varias bandas en una misma muestra (producto de PCR usando los imprimadores específicos), lo que evidencia el polimorfismo de los virus estudiados. Especialmente, con *Tomato mosaic havana virus*, con el que se identificaron 9 bandas. Dados, estos resultados, se recalca la importancia del estudio de las diferentes especies de begomovirus que circulan en los campos debido a su diversidad y posibilidad de originar cepas (o nuevas especies) más virulentas.

VIII. CONCLUSIONES

- A. El porcentaje de hembras *B. tabaci* en los cinco lugares muestreados siguen una tendencia similar en las diferentes épocas del año.
- B. Cuando una especie (*B. tabaci* o *T. vaporarorium*) presenta alta abundancia, la otra disminuye su población.
- C. En los últimos meses del año, aparecen otras especies (*T. abutiloneus*, *B. tuberculata* y otras no identificadas).
- D. De las 545 muestras analizadas de *B. tabaci* 341 dieron resultado positivo, lo que equivale al 62.6% del total de muestras, siendo los promedios por lugar: Salamá 60.4%, Retana 71.8%, Área central 63.6%, Esquipulas 51.1% y Santa Rosa 64.7%).
- E. En los meses de baja virulencia de *B. tabaci*, se detectaron muestras positivas de *T. vaporarorium*, lo que sugiere que en el campo siempre hay virus circulante.
- F. De las 338 muestras analizadas de *T. vaporarorium* 110 dieron resultado positivo, lo que equivale al 32.5% del total de muestras, siendo los promedios por lugar: Salamá 39.34%, Retana 38.55%, Área central 22.5%, Esquipulas 27.03% y Santa Rosa 40%).
- G. Se ha incrementado la relación de begomovirus detectado en *B. tabaci* en relación con estudios anteriores.
- H. Con excepción de Esquipulas (agosto a septiembre), en los otros valles, los meses con menor incidencia de virus son de abril hasta julio.
- I. Los meses con mayor incidencia de begomovirus general varían según el lugar. Hay dos incrementos, uno entre final y principios de año (meses posteriores a las lluvias) y el otro posterior a los meses con menos virulencia.
- J. La incidencia de virosis en *T. vaporarorium*, disminuye a los niveles más bajos de abril a mayo y aumenta en junio a septiembre y febrero a marzo.
- K. No se encontró correlación lineal entre la cantidad de hembras *B. tabaci* circulante y virosis detectada.
- L. Con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, la distribución de muestras positivas y negativas de begomovirus general es igual en todos los lugares muestreados.
- M. Los períodos de veda sugeridos son: Salamá julio-agosto, Laguna de Retana agosto-septiembre, área central febrero-marzo, Esquipulas octubre-noviembre y Santa Rosa diciembre-enero.

- N. Con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, la distribución de muestras positivas y negativas por sector de *Pepper golden mosaic virus*, *Tomato mosaic havana virus*, *Pepper Huasteco yellow vein* y *Tomato severe leaf curl virus* es igual.
- O. No fue posible establecer un patrón de bandas característico de cada virus (usando los imprimadores degenerados).
- P. Aparecen varias bandas en una misma muestra (producto de PCR usando los imprimadores específicos), lo que evidencia el polimorfismo de los virus estudiados. Especialmente, en *Tomato mosaic havana virus* (se detectaron 9 bandas diferentes).

IX. RECOMENDACIONES

- A. Prolongar el monitoreo por lo menos dos años más para corroborar el patrón de comportamiento. Además de tomar en cuenta otros factores como datos climáticos.
- B. Monitorear la incidencia de begomovirus en sus hospederos (primarios y secundarios) para determinar si los virus específicos circulantes son adquiridos por las plantas en la misma proporción.
- C. Implementar otra técnicas identificar virus específicos, que permita la corrida de mayor número de muestras simultáneas (por ejemplo hibridización de ácidos nucleicos).
- D. Aumentar el número de muestras o réplicas tanto en la detección de begomovirus general como específico.
- E. Analizar más muestras por medio de la técnica de SSCP.
- F. Identificación de begomovirus que no se amplificaron con los imprimadores específicos mediante secuenciación y comparación con secuencias previamente analizadas.
- G. Identificación y monitoreo de otros vectores de geminivirus, por ejemplo *Bemisia tuberculata*.

X. LITERATURA CITADA

1. Antoniow J. y M. Adams. 2007. **Description of plant viruses.** Disponible en <http://www.dpvweb.net/index.php>
2. Arias K. 2003. **Tomate: situación nacional e internacional, mercado nacional.** Subgerencia de desarrollo agropecuario, Dirección de Mercadeo y agroindustria. Año 1 informe 1.
3. Brown T. 1995. **Gene cloning.** 3ra edición. Chapman & Hall. Manchester UK. 334pp.
4. Carabali A. 2004. **Potencial de resistencia de diferentes genotipos de yuca *Manihot esculenta Crantz* al “biotipo B” de mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: *Aleyrodidae*).** Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Cali, Colombia. p. 99.
5. Bohmfalk, G., R. Frisbie, W. Sterling, R. Metzger y A.E. Knutson. 2004. **Identification, biology and sampling of cotton insects.** Texas A&M University Department of Entomology. Disponible en: <http://images.google.com.gt/imgres?imgurl=http://insects.tamu.edu/images/insects/color/cotton/ctn084.jpg&imgrefurl=http://insects.tamu.edu/extension/bulletins/b-933.html&h=242&w=252&sz=24&hl=es&start=4&um=1&tbnid=GayjvPfNXNcSCM:&tbnh=107&tbnw=111&prev=/images%3Fq%3Dwhitefly%2B%252Blife%2Bcycle%26svnum%3D10%26um%3D1%26hl%3Des%26lr%3D%26sa%3DG>
6. De La Torre-Almaráz, *et. al.* 2002. **Caracterización de un geminivirus en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa B.*) en la región centro de México.** Agrociencia, 36: 471-481. 2002.
7. Fauquet C. y Stanley J. 2003. **Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems.** Association of Applied Biologists, 142:165-189.
8. Federación de Asociaciones Agrícolas de Guatemala (FASAGUA). 2007. **Programa de monitoreo de mosca blanca.** Disponible en <http://www.fasagua.com/default.php?lng=&showpage=36>
9. Federes A. 2003. **Transmisión de virus vegetales por artópodos y sus implicaciones epidemiológicas.** III congreso nacional de entomología aplicada IX jornadas científicas de la sociedad española de entomología aplicada Sesión XII: transmisión de virosis. p 155-158.
10. Fernández, P. y Díaz, P. 2001. **Metodología de la investigación. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística.** Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña (España. Cad Aten Primaria 1997; 4: 141-144.
11. Freund R. y W. Wilson. 1997. **Statistical methods.** Academic Press. Estados Unidos p. 593
12. Guharay, F. 1994. **Biología y Manejo del complejo de Mosca blanca y virosis.** Memorias III taller Centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca. Antigua Guatemala. P 58.

13. ICTVdB Management. 2006. **The Universal Virus Database, version 4**. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
14. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación: MAGA Guatemala, Centro America). 2006. **Tomate y chile guatemalteco**. Disponible en http://www.maga.gob.gt/maga_portal/index.php?option=com_content&task=view&id=185
15. Méndez. J., I Torres, C. Fauquet y F Rivera. 2003. **Interactions between Geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus***. *Phytophalogy*, 93:270-277.
16. Martínez, Y., M. Quiñones, D. Fonseca e I. Miranda. 2003. **Prospección nacional de begomovirus presentes en el cultivo de tomate en cuba**. *Protección Vegetal*, 18:168-175.
17. Mejía. L. 19963. **Enrrollamiento de la hoja del tomate el complejo mosca blanca-virus géminis**. Agricultura. Guatemala.
18. Mejía, L. 1999. **Evaluación de genotipos de tomate (*Lycopersicon esculatum* Mill) para resistencia a virus géminos-transmitidos por mosca blanca y su detección por PCR**. FONACYT proyecto No.28, Informe Final. Guatemala. p. 5.
19. Mejía, L. y D. Dardón. 1994. **Biología y Manejo del complejo de Mosca blanca y virosis**. Memorias III taller Centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca. Antigua Guatemala. P 109.
20. Nakhla. M., A. Sorensen, L. Mejía, P. Ramírez, J. Karkashian y D. Maxwell. 2005. **Molecular Characterization of Tomato-Infecting Begomoviruses in Central America and Development of DNA-Based Detection Methods**. *Acta Hort*. 695:277-288.
21. Naranjo, S., L. Cañas y P. Ellsworth. 2004. **Mortalidad de *Bemisia tabaci* en un sistema de cultivos múltiples**. *Horticultura general*, 43:14-21
22. Orozco, M 1999. **Empleo de marcadores moleculares para identificar Geminivirus en *Bemsia tabaci* (Gennadius) y la relación entre sus diferentes biotipos en cultivos del sur y nor-oriente de Guatemala**. Trabajo de graduación. Universidad del Valle de Guatemala.
23. Palmieri, M., J. Brown., M. Méndez., M. Orozco., L. Pineda. y L. López. 1999. **Marcadores moleculares para la identificación y monitoreo de la distribución de geminivirus y biotipos de *B. tabaci* en plantaciones del sur y Valle de Motagua, en Guatemala**. FONACYT proyecto No.21, Informe Final. Guatemala. p. 137.
24. Palmieri, M., R. Gilbertson, A. Ávalos, J. Melgar. 2005. **Monitoreo de la infección por diferentes begomovirus de *B. tabaco*, en campos de tomate (*Lycopersicon esculatum*), como criterio de alerta para establecer períodos libres de hospederos de begomovirus o períodos adecuados para la siembra de tomate en diferentes regiones del país**. Propuesta de proyecto AGOCYT. Sin publicar.

25. Ramírez y Maxwell 1994. **Diversidad de los geminivirus transmitidos por moscas blancas.** . Memorias III taller Centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca. Antigua Guatemala. P 105.
26. Poltson, J. y P. Anderson. 1997. **The emergence of whitefly-Transmitted Geminiviruses in tomatoe in the Western Hemisfere.** Plant disease, 81: 1358-1368.
27. Development core team. 2006. **R: lenguaje and enviroment of stasticical computing.** R. foundation of statistical computing. Viena, Austria. ISBX1 3-900051-07-0. Disponinible en: <http://www.R-proyect.org>.
28. Rosell, R., I. Torres-Jerez y J. Brown. 1999. **Tracing the Geminivirus-Whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew.** Virology, 83:239-246.
29. Ramírez, P. y D. Maxwell. 1994. **Geminivirus transmitidos por moscas blancas.** En memorias del III taller centroamericano y del caribe sobre mosca blanca. 95p.
30. Rivera R. y R. Ruiz. 1997. **Los Geminivirus: patógenos de Plantas como Modelos.** Instituto Politécnico Nacional México, D. F. p 311-324.
31. Salguero, R.. 1994. **Biología y Manejo del complejo de Mosca blanca y virosis.** Memorias III taller Centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca. Antigua Guatemala. P 16.
32. Singh, R. y U. Singh. 1995. **Molecular methods in plant pathology.** Lewis Publishers. Estados Unidos. P. 523.
33. Vega, J., R. Rivera. 2001. **Los virus: cómplices para descifrar Procesos moleculares en las plantas.** Avance y Perspectiva, 20:349-355.
34. Wyatt S. y J. Brown. 1996. **Detection of subgroup III Geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction.** Phythopathology, 86:1288-1293.

XI. APÉNDICES

A. Apéndice A: Soluciones utilizadas

1. Preparación de solución amortiguadora de lisis para mosca blanca

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

2. Mezcla de reacción para detección de geminivirus general por PCR

Reactivo	Concentración stock	Volumen a agregar del stock
Agua doble destilada	--	12.25 µL
Solución Amortiguadora	10X	2.5 µL
MgCl ₂	25mM	2.5 µL
Cebador 514	20mM	0.75 µL
Cebador 1048	20mM	0.75 µL
dNTP's	2.5mM	1.5 µL
Taq ADN polimerasa	5U/µL	0.25 µL
ADN	--	4.5 µL

Agregar una gota de aceite mineral estéril a cada tubo de reacción PCR (para evitar evaporación) antes de colocar en termociclador.

3. Mezcla de reacción para identificación de virus específico de mosca blanca por PCR

Reactivo	Concentración stock	Volumen a agregar del stock
Agua doble destilada	--	5.3 µL
Solución Amortiguadora	10X	5 µL
MgCl ₂	25mM	3 µL
Cebador 1	20mM	2 µL
Cebador 2	20mM	2 µL
dNTP's	2.5mM	2.5 µL
Taq ADN polimerasa	5U/µL	0.2 µL
ADN	--	5 µL

Agregar una gota de aceite mineral estéril a cada tubo de reacción PCR (para evitar evaporación) antes de colocar en termociclador

4. Preparación del gel de agarosa

Para 30 ml de agarosa:

Reactivo	Cantidad
Agarosa	0.3g
TAE 1 X	30 mL

Mezclar los reactivos, calentar hasta disolverlos, colocarlos en la cámara de electroforesis hasta que solidifiquen.

5. Stock de buffer TAE 50X, para un litro

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

Ajustar volumen a un litro con 980 ml. de agua doble destilada y esterilizar el stock.

6. Buffer TAE 1X, para un litro

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

7. Soluciones para la preparación de un gel de poliacrilamida 30%

Reactivo	cantidad
Acrilamida-bisacrilamida (24:1) 30%	4.33mL
TBE 5X	1.3mL
Agua destilada	7.37mL
Filtrar y degasificar, luego agregar	
TEMED	13µL
APS 25% p/v	45µL

8. Soluciones de archilamida-bisacrilamida 30% (proporción 24:1)

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	14.4g
Bisacrilamida	0.6g

Aforar a 50mL con agua doble destilada y guardar en la oscuridad

9. APS 25% p/v

Reactivo	Cantidad
APS	61.5mg
Agua destilada	125µL

10. EDTA 0.5M pH 8

Reactivo	Cantidad
EDTA	372.2g
NaOH	40g
Agua destilada	2000mL

11. TBE 5X, para un litro

Reactivo	Cantidad
Tris Base	54.0g
Ácido bórico	27.5g
EDTA 0.5M pH8	30mL
Glicerol	5.0mL

Ajustar volumen a un litro con 65.3mL de agua doble destilada y esterilizar el stock

12. TBE 0.5X

Reactivo	Cantidad
TBE 5X	100mL
Agua destilada	1000mL

13. Solución amortiguadora de carga desnaturizante

Reactivo	Cantidad
Formamida	9mL
NaOH 1M	0.2mL
Xilen cianol	0.005g
Azul de bromofenol	0.005g

Aforar a 10mL con agua destilada

14. Ácido acético 10%

Reactivo	Cantidad
Ácido acético	20mL
Agua destilada	180mL

15. Solución reveladora del gel de poliacrilamida (carbonato de sodio)

Reactivo	Cantidad
Carbonato de sodio	4.5g
Formaldehído 37%	225 μ L
Solución de Tiosulfato de sodio	1.5 μ L

16. Solución colorante del gel de poliacrilamida (nitrato de plata)

Reactivo	Cantidad
Nitrato de plata	0.15g
Formaldehído 37%	225 μ L

La solución debe prepararse fresca y guardarse en la oscuridad

17. Solución de tiosulfato de sodio

Reactivo	Cantidad
Tiosulfato de sodio	0.225g
Agua destilada	0.5mL

B. Apéndice B: Programas de PCR y secuencias de imprimadores

1. Programa de amplificación para detección de geminivirus por PCR

Paso 1: 2 minutos a 95°C
 Paso 2: 1.30 minutos a 95°C
 Paso 3: 1.30 minutos a 58°C
 Paso 4: 1.30minuto a 72°C
 Al Paso 2, 30 veces
 Paso 5: 10 minutos a 72°C
 Paso 6: 4°C indefinidamente

2. Secuencia de iniciadores degenerados

p515
 5' G C C C A T G T A T A G A A A G C C A A G 3'
 A A G

p1048
 5' G G A T T A G A G G C A T G T G T A C A T G 3'
 G G A A
 T C

(Brown 1996)

3. Programa de amplificación para identificación de geminivirus específico por PCR

Paso 1: 30 segundos a 96°C

Paso 2: 30 segundos según de anidado annealing de primer específico (ver cuadro siguiente)

Paso 3: 35 segundos a 72°C

Al Paso 1, 30 veces

Paso 6: 4°C indefinidamente

4. Secuencias de iniciadores específicos

Virus que amplifica	Secuencia	Temperatura de <i>anealing</i>
<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	5'TGTAAATATGAGCCAGGACACCAGG 3' 5'AATTGCCCCTTGGTGTCCCAAGAGG 3'	60°C
<i>Tomato mosaic havana virus</i>	5'GTAATTAAGGGTGTCTCCAATTGAGC 3' 5'GTCTCCAAGCGTATCTGAGG 3'	58 °C
<i>Pepper golden mosaic begomovirus</i>	5'GTAGGATACCCAATTGAGCTTTCTTCG 3' 5'CGGATGAGATTGAAAGTTCTATAGGACC 3'	60 °C
<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	5'GTAATTTGGAGCTGTACACCAATTGAGC 3' 5'GCCACGTGTAGGAACAAGAATTAATAGTTCTATAGAGG 3'	55 °C

(Nakhla *et al.* 2004)