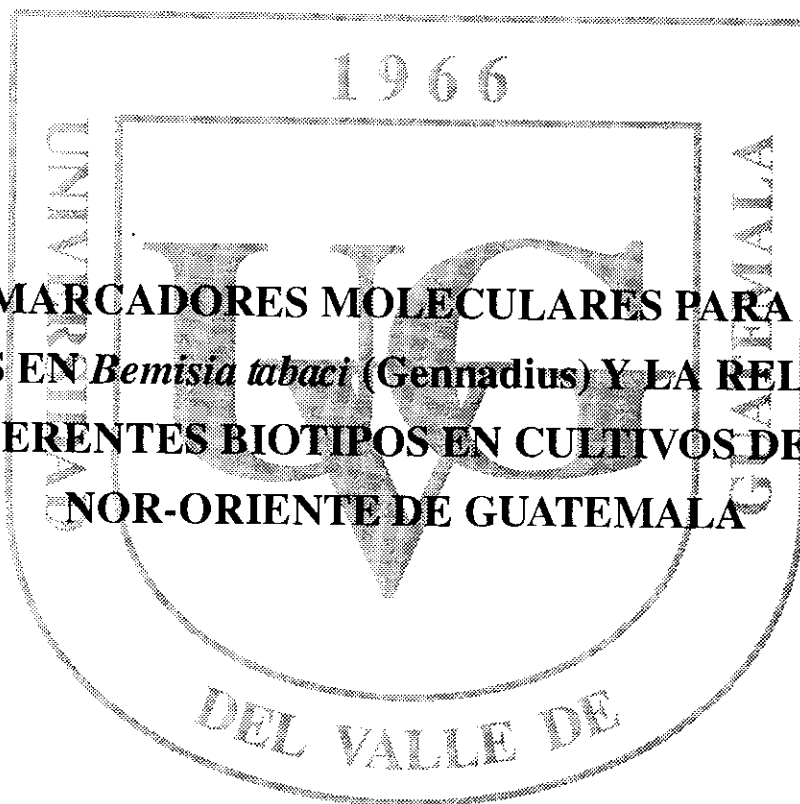


UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

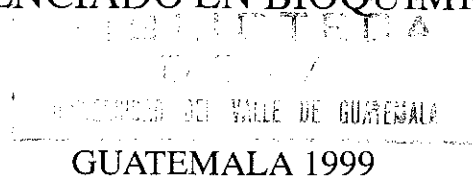


**EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAR  
GEMINIVIRUS EN *Bemisia tabaci* (Gennadius) Y LA RELACIÓN ENTRE  
SUS DIFERENTES BIOTIPOS EN CULTIVOS DEL SUR Y  
NOR-ORIENTE DE GUATEMALA**

**MÓNICA NINETTE OROZCO FIGUEROA**

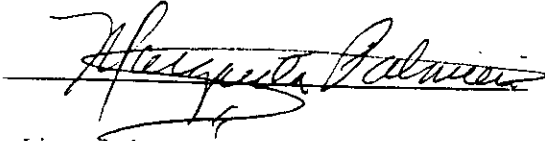
Trabajo de Graduación presentado para optar  
al grado académico de

**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA**

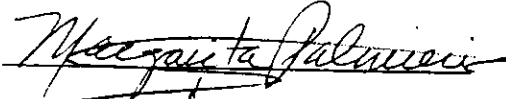


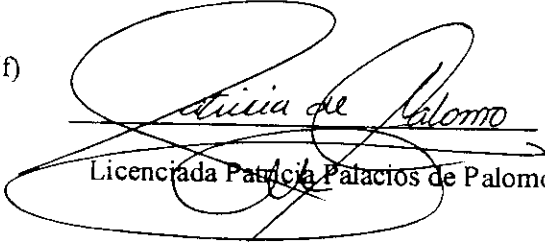
EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAR GEMINIVIRUS EN  
*Bemisia tabaci* (Gennadius) Y LA RELACION ENTRE SUS DIFERENTES BIOTIPOS EN  
CULTIVOS DEL SUR Y NOR-ORIENTE DE GUATEMALA

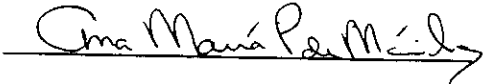
Vo.Bo.

(f)   
Licenciada Margarita Palmieri  
Asesora

Tribunal:

(f)   
Licenciada Margarita Palmieri

(f)   
Licenciada Patricia Palacios de Palomo

(f)   
Licenciada Ana María de Mérida

Fecha de Aprobación:

A Dios,  
a mis padres,  
a mi hermana y  
a mis abuelitos

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle por permitirme realizar este trabajo de investigación, con un grupo de profesionales.

Quiero agradecer a la Licenciada Margarita Palmieri por su asesoría y por brindarme la oportunidad de trabajar con ella en su laboratorio. Le agradezco enormemente toda su paciencia, apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que trabajan en el laboratorio de virología, las cuales me proporcionaron su ayuda y amistad. A Carolina, Maru, Lourdes, Luis y Edgar les agradezco su calidez y generosidad.

También quiero agradecer a la Licenciada Ana María de Mérida y a Edu por toda su bondad y amabilidad. Les agradezco mucho el haberme prestado su equipo y sacarme de apuros tantas veces.

A mis compañeros de clase les doy gracias por el apoyo que me brindaron en los momentos difíciles y por las alegrías que vivimos juntos durante todos estos años de universidad.

Finalmente gracias a mis papás por todos sus sacrificios, apoyo, cariño y principalmente por toda la fe que tuvieron en mi.

## RESUMEN

En este estudio se analizaron 732 especímenes de *Bemisia tabaci* colectados en varias localidades de los departamentos de Escuintla y Suchitepequez, en la región sur; y en los departamentos de El Progreso, Jutiapa, Jalapa y Zacapa, en la región oriental de Guatemala. Se tomaron muestras en cultivos de tomate, chile, tabaco, frijol y cucúrbitas, en general. Las colectas se efectuaron en dos temporadas distintas: durante marzo y abril de 1998 y de noviembre a diciembre de 1998.

Se efectuó el diagnóstico de geminivirus por medio del análisis de PCR (Reacción de la polimerasa en cadena) con imprimadores específicos, con los cuales se amplificó una secuencia situada en el gen que codifica para la cápside de proteína, localizado en el ADN-A del genoma del geminivirus. Se detectaron 108 muestras positivas para geminivirus, lo que representa 15% de las muestras totales analizadas.

Por medio de un análisis de varianza, empleando el programa estadístico SPSS, se determinó la relación entre la presencia de geminivirus y varios factores como: biotipo de *Bemisia tabaci* que lo transmite, cultivo, región y altitud en donde se encuentran estos cultivos. Se concluyó que existen preferencias por parte de los geminivirus hacia ciertos cultivos, biotipos y rango de altitudes en donde se efectuaron las colectas. La distribución de geminivirus es similar en las regiones sur y oriental y no varía considerablemente antes de la época lluviosa, ni después de la misma.

A las muestras que resultaron positivas por este análisis se les efectuó el análisis de SSCP para determinar polimorfismos entre las muestras de geminivirus. Se determinó que si existe polimorfismo en la secuencia amplificada por PCR perteneciente al gen que codifica para la proteína de cobertura de geminivirus. Estos polimorfismos se traducen como diferentes tipos de geminivirus, los cuales se clasificaron en 13 patrones de bandas de SSCP, todos aparentemente distintos. Se observó que el patrón 1 era el más frecuente. Se encontró una mayor variabilidad de geminivirus en la región oriental que en la sur; ya que en la región oriental se encontraron 7 tipos

de virus que no se encontraron en el sur. Se notó que el biotipo no B de *Bemisia tabaci* transmite una mayor cantidad de tipos de geminivirus que el biotipo B.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	
A. Mosca blanca, <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	2
1. Generalidades de la mosca blanca, <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	2
2. Biotipos de mosca blanca	4
B. Geminivirus	6
1. Genoma	6
2. Enfermedades causadas por los geminivirus de mosca blanca	8
a) Enfermedades de cucúrbitas	8
b) Enfermedades de la okra ( <i>Abelmoschus esculentus</i> )	9
c) Enfermedades de las leguminosas	9
d) Enfermedades de las solanaceas	10
3. Transmisión del geminivirus por <i>B. tabaci</i>	10
4. Diagnóstico y detección	11
a) La técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction)	11
i) Secuencias iniciadoras	13
ii) Taq ADN polimerasa	14
iii) Deoxiribonucleósidos trifosfatados (dNTP's)	14
v) Soluciones amortiguadoras	14
c) Diagnóstico por PCR	15
b) PCR-SSCP (PCR- single strand conformation polymorphism)	16
i) Tinción en plata	16
III. OBJETIVOS E HIPOTESIS	18
IV. MATERIALES Y METODOS	20
V. RESULTADOS Y DISCUSION	24
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	40
VIII. BIBLIOGRAFIA	41

	Página
APENDICES	
A. Soluciones utilizadas en metodología y programas de PCR	44
B. Lista de Materiales y Equipo	47
C. Patrones de SSCP de las muestras positivas para geminivirus	49
D. Cuadros de datos y resultados	50
E. Análisis estadístico SSCP	65

## CUADROS Y FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de la mosca blanca	3
Figura 2. Organización genómica de los geminivirus bipartitos transmitidos por <i>Bemisia tabaci</i>	7
Cuadro 1. Distribución de patrones de SSCP según cultivo	29

## GRAFICAS

	Página
1. Porcentaje de muestras positivas para geminivirus	21
2. Distribución de geminivirus según biotipo de <i>Bemisia tabaci</i>	21
3. Distribución de geminivirus según cultivo	23
4. Distribución de geminivirus según biotipo de <i>Bemisia tabaci</i> en diferentes cultivos	24
5. Distribución de geminivirus de acuerdo a región de muestreo	24
6. Distribución de geminivirus según biotipo de <i>Bemisia tabaci</i> en las regiones sur y oriental de Guatemala	25
7. Distribución de geminivirus según altitud	26
8. Distribución de geminivirus según biotipo de <i>Bemisia tabaci</i> a diferentes altitudes	27
9. Distribución de geminivirus según la época de colecta	27
10. Distribución de patrones de SSCP de las muestras positivas para geminivirus	29
11. Distribución de patrones de SSCP según biotipo de <i>Bemisia tabaci</i>	30
12. Distribución de geminivirus según región de muestreo	31

## I. INTRODUCCION

La agricultura representa una de las principales fuentes de divisas para Guatemala. Debido a ésto es de gran importancia comprender y estudiar las diferentes patologías y plagas que afectan a los principales cultivos. *Bemisia tabaci*, una especie de mosca blanca, representa un serio problema en muchos agrosistemas tanto de la región oriental como de la sur. Este insecto no sólo provoca daño mecánico en muchos cultivos sino también es el principal vector de geminivirus en varias especies de hortalizas. Los geminivirus causan el apareamiento de síntomas fitopatológicos como clorosis, enanismo y acoloramiento y en casos extremos puede causar la muerte de la planta. Se ha investigado poco acerca de la biología y comportamiento de este insecto, así como su relación con los geminivirus que transmite.

En este estudio se pretende detectar e identificar los geminivirus en mosca blanca, lo que permitirá comprender mejor la interacción que existe entre virus y vector. Además se determinará si existe una relación entre la presencia de geminivirus y el tipo de cultivo que infecta, así como su relación con el biotipo de mosca blanca que lo transmite y la altitud y región en la que se encuentran los cultivos afectados.

Para la detección de geminivirus se emplearán imprimadores degenerados que amplifican una secuencia específica en el gen que codifica para la proteína de cápside del virus y que se encuentra en las moléculas del anillo A del ADN circular del geminivirus.

Con ésto se pretende comprender un poco más el comportamiento y biología de este vector, lo que nos permitirá diseñar medidas más específicas y eficientes para la prevención y control del insecto.

## II. ANTECEDENTES

### A. Mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius)

#### I. Generalidades de mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius):

La mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius), es un insecto perteneciente a la familia Aleyrodidae y al orden Hemiptera. Su cuerpo es amarillo pálido y posee alas blancas. Este insecto posee un estilete (boca en forma de pico), por medio del cual succiona la savia de las plantas, debilitándolas (Salguero, 1994), debido a ésto, causa gran preocupación entre los agricultores alrededor del mundo debido a que genera severas pérdidas en la agricultura (Traboulsi, 1994). Su presencia se ha reportado en más de 90 países, principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Provoca daños en los cultivos en varias formas incluyendo daño directo debido a la alimentación de los individuos, produce sustancias ricas en azúcares, las cuales pueden abonar la superficie de la planta y está asociada con el crecimiento de hongos (fumaginas) sobre el follaje y los frutos (Perring; et al. 1991). La transmisión de geminivirus, es el factor más complicado, debido a que éstos atacan el sistema vascular, provocando deformaciones severas en las hojas y otros órganos de las plantas. Esto reduce significativamente los rendimientos y en el peor de los casos se pierde completamente la cosecha debido a que la planta aborta la totalidad de las flores y frutos ya desarrollados. Los frutos que se logra cosechar son de mala calidad, pequeños y de un color poco atractivo (Calderón, 1995).

De las 100 especies de mosca blanca identificadas, únicamente tres han sido reconocidas como vectores de virus (Brown, 1991). Esta importante plaga ataca a más de 500 especies vegetales pertenecientes a 74 familias de dicotiledóneas incluyendo cultivos vegetales, agronómicos, ornamentales y malezas (Mehta, et al, 1994). Por ejemplo, se han reportado 96 especies hospederas para la familia Fabaceae, 56 para Compositae, 35 para Malvaceae, 33 para Solanaceae, 32 para Euphorbiaceae, 20 para Convolvulaceae y 17 para Cucurbitaceae (Brown y Bird, 1992).

*B.tabaci* es un insecto primordialmente tropical/subtropical, pero también se ha encontrado en climas templados. Bajo condiciones favorables, se pueden completar entre 11 a 15 generaciones en un año, con hembras depositando entre 100 a 300 huevos en un período de tres a seis semanas (Brown, 1991).

El ciclo de vida de la mosca blanca comprende seis estadios:

- a. Huevo
- b. Tres estadios inmaduros “ninfales” o “larvarios”
- c. Un cuarto estadio inmaduro
- d. Adulto.

La mosca blanca pone sus huevos en el envés de las hojas, de los cuales emerge la ninfa; el primero de los tres estadios inmaduros (Salguero, 1994). El primer estadio es móvil, y puede desplazarse a lo largo de la superficie de la hoja hasta encontrar un lugar seguro para asentarse y alimentarse. El segundo, tercer y cuarto estadios son sésiles (Traboulsi, 1994). Del cuarto estadio ninfal sale la mosca adulta. El desarrollo de huevo a adulto tarda 18 ó 19 días (en clima frío, puede tardar más) (Salguero, 1994). Aunque los adultos pueden recorrer pequeñas distancias de unos cuantos metros, las moscas generalmente se movilizan dentro de la bóveda de la planta y en las plantas vecinas. Pueden dispersarse a lo largo de grandes distancias si son atrapadas por corrientes de aire y vientos (Traboulsi, 1994). Cuando sus poblaciones son altas o la planta es vieja, vuelan buscando plantas más jóvenes. Los adultos viven unos 11 ó 14 días más. Estos insectos se reproducen más fácilmente en época seca (noviembre a mayo) o en invierno, cuando las lluvias son muy escasas (Salguero, 1994).

Aunque los estadios tardíos del vector *B.tabaci* son capaces de contraer el virus, los adultos son los más importantes en la movilización del geminivirus entre las plantas hospederas (Brown, 1991).

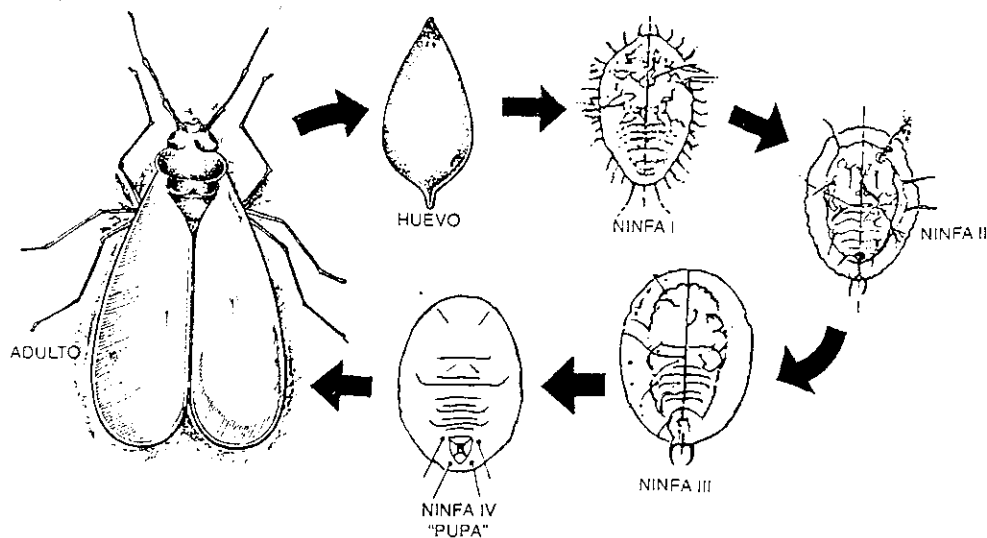


Figura 1: Ciclo de vida de la mosca blanca

## 2. Biotipos de mosca blanca:

— El término biotipo fue introducido para denominar a las poblaciones de *B. tabaci* que podían diferenciarse de acuerdo a su habilidad para colonizar un espectro distinto de especies vegetales (Brown & Bird, 1992).

Se ha demostrado la existencia de variabilidad biológica y genética entre colecciones internacionales de *B. tabaci*. Las poblaciones de *B. tabaci*, que están geográficamente aisladas y por consiguiente aisladas reproductivamente, son referidas como biotipos o razas. Estas poblaciones difieren en su habilidad de utilizar plantas hospederas particulares para propósitos de alimentación y reproducción y en características de transmisión de virus, pero son indistinguibles al basarse en sus características morfológicas. Aunque la significancia de estas diferencias aún no ha sido determinada en términos de epidemiología de enfermedades, se tiene claro que las interacciones entre la mosca blanca y la planta hospedera son de gran importancia para la transmisión exitosa de los geminivirus (Brown, 1991).

Se ha determinado que existe gran variabilidad genética en las poblaciones de *B. tabaci* en Centroamérica, lo que ha dado lugar a la diferenciación en biotipos. Se ha reportado la aparición de un biotipo "B" en las poblaciones de *B. tabaci* de los Estados Unidos. A este biotipo "B" se le asocian características que lo hacen más perjudiciales que el biotipo "A". Este nuevo biotipo tiene un rango de hospederos más amplio que el biotipo A, posee una mayor capacidad de alimentación, mayor fecundidad y asociación con alteraciones fitotóxicas. En Centroamérica se han determinado, además del biotipo "B", otros previamente clasificados como "C", "D" y "G" (Caballero, 1992).

Los apareamientos individuales entre biotipos A y B no producen crías hembras mientras que los cruces entre individuos del mismo biotipo generan tanto machos como hembras. Debido a que los machos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados y son haploides, las hembras son diploides al ser creadas únicamente de huevos que han sido fertilizados. Otra diferencia importante es que ambos biotipos transmiten diferentes virus (Perring, et al, 1993).

El biotipo B, actualmente se ha dispersado casi a nivel mundial. La característica predominante de este biotipo es su extraordinaria capacidad de adaptarse a un rango extremadamente amplio de especies de plantas hospederas. Se ha descubierto que esta peste es resistente a insecticidas pertenecientes a varias clases de químicos de amplio uso, incluyendo DDT y metil paration (Brown, 1991).

El biotipo A y B difieren en varias características genéticas distintivas. Cada biotipo tiene uno o más alelos únicos en seis loci no encontrados en el otro y muestran diferencias alélicas fijas en cuatro loci (Perring, et al, 1993).

Basados en estudios efectuados con patrones de esterases, se ha concluido que el biotipo B se ha dispersado por toda América Central y probablemente en América del Sur. También se ha sugerido que otros biotipos no antes reconocidos pueden existir en estas regiones (Brown, 1993).

## B. GEMINIVIRUS:

Numerosas enfermedades en plantas en las regiones tropicales y subtropicales son causadas por geminivirus, la cual es una familia que contiene aproximadamente 50 miembros. (Fields, 1996) Los geminivirus se caracterizan por su diversidad molecular, diferentes geminivirus infectan el mismo cultivo en diferentes regiones geográficas del mundo. (Ramírez, 1995) Estos han sido clasificados en tres subgrupos basados en la planta hospedera, el insecto vector y su estructura genómica. Los geminivirus del subgrupo I infectan plantas monocotiledóneas mientras que los del subgrupo II infectan plantas dicotiledóneas. El subgrupo I y II poseen genomas monopartitos y son transmitidos por cicadélidos. Los miembros del subgrupo III tienen genomas bipartitos y son transmitidos por mosca blanca (Fields, 1996).

No se han obtenidos análisis estructurales detallados de las partículas de geminivirus, pero se cree que consisten en dos icosaedros unidos que contienen 110 subunidades proteínicas (de aproximadamente 28 kD) arregladas en 22 capsómeros. Las dimensiones de cada partícula son de aproximadamente 20 x 30 nm. La disposición física del ADN en la partícula se desconoce aún (Fields, 1996).

### 1. Genoma:

Los geminivirus que infectan plantas dicotiledóneas y son transmitidos por *B.tabaci* generalmente tienen el genoma bipartito, constituido por dos moléculas de ADN de hebra simple circular (2.6 kb para el monopartito y 5.2 kb para el bipartito) y de tamaño similar pero no idénticas (ADN-A y ADN-B). No obstante, se han reportado virus con genoma monopartito transmitidos por mosca blanca. El genoma de los geminivirus bipartitos tiene una organización común con cuatro genes en el ADN-A denominados AL1, AL2, AL3 y ARI y dos genes en la molécula de ADN-B llamados BL1 Y BRI. En la mayoría de los geminivirus bipartitos se requieren ambas moléculas de ADN para inducir la infección (Ramírez, 1995).

Se demostró que los genomas de algunos geminivirus causantes de varias enfermedades en algunos cultivos poseían una composición y organización genética similar. Para cada uno de estos virus, la secuencia de nucleótidos de las dos moléculas de ADN es diferente, excepto por una región pequeña del genoma total, que es casi idéntica en las dos moléculas de ADN de un mismo virus. A esta región se le denomina “región común” (Morales, 1995).

El ADN-A codifica para todas las funciones necesarias para la multiplicación del virus y la encapsidación del ADN viral. Se ha demostrado que la molécula de ADN-A está asociada con la modulación de las concentraciones de la cápside proteica viral, así como con la expresión de los síntomas. El ADN-B codifica para las funciones asociadas con el movimiento sistémico viral en la planta infectada (Ramírez, 1995).

El genoma de los geminivirus transmitidos por cicadélidos (sub-grupos I y II) posee sólo una molécula de ADN de cadena sencilla. Los geminivirus del sub-grupo III poseen unos seis genes potencialmente capaces de modificar proteínas, los cuales están repartidos entre las dos moléculas de ADN. Uno de estos genes es el responsable de producir la cubierta proteica del ADN viral. La secuencia de aminoácidos de esta proteína es muy similar en todos los geminivirus estudiados transmitidos por *B. tabaci*, lo cual explica la existencia de un vector común y esto se debe a que la cápside viral es la que determina en gran parte la especificidad de transmisión de un virus por una clase de vector (Ramírez, 1995).

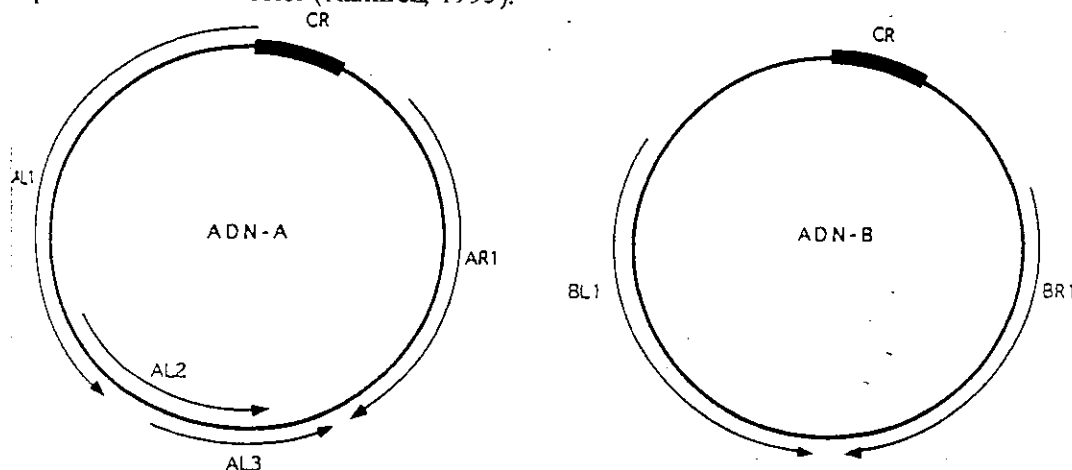


Figura 2: Organización genómica de los geminivirus bipartitos transmitidos por mosca blanca (Ramírez, 1995)

## 2. Enfermedades causadas por los geminivirus de mosca blanca

Las enfermedades causadas por los geminivirus transmitidos por *B.tabaci* se han convertido en un problema grave para la producción sostenible de los cultivos en las regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. Además de los geminivirus transmitidos por mosca blanca y hasta ahora descritos, se ha estimado que en el Nuevo Mundo aún quedan 40 o más virus sin caracterizar (Brown, 1991). Estas enfermedades están caracterizadas por uno o más de los siguientes síntomas: amarillamiento severo, mosaico dorado, enrollamiento de hojas y enanismo (Green, 1994).

La epidemiología de los geminivirus transmitidos por mosca blanca está caracterizada por la correlación cercana entre la incidencia de la enfermedad y las poblaciones de mosca blanca las cuales muestran fluctuaciones fuertes en cada estación. Este factor ha sido importante en el desarrollo de ciertos métodos de control basados en el tiempo de trasplante. Hasta ahora no hay evidencia de transmisión del geminivirus por semillas (Green, 1994).

A continuación se resumen nuevas enfermedades de gran importancia causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca.

### a) Enfermedades de cucúrbitas

Hasta la fecha, se han identificado dos geminivirus transmitidos por mosca blanca en cucúrbitas: virus del enrollamiento de hoja de la calabaza (SLCV), la cual causa síntomas fitotóxicos en pepino, melón, calabaza, sandía y melón silvestre; y el virus de enrollamiento de la sandía (WCSV) de la Península arábiga. El SLCV fue documentado por primera vez en Guatemala, Honduras y Nicaragua entre 1990 y 1992. Este virus causa enrollamiento de hojas y enanismo moderado y éstos se desarrollan aproximadamente entre los 10 a 15 días después de la infección. Las plantas infectadas producen abundancia de flores que abortan y frutos que no se desarrollan adecuadamente (Brown, 1991).

El complejo formado entre el SLCV y el virus del moteado y enrollamiento de la sandía (WCMoV) causa enfermedades severas en los cultivos de *Cucurbita foetidissima*, *C. maxima*, *C. pepo* y *C. moschata*. Los síntomas consisten en enrollamiento severo de las hojas, mosaico con "ventanas" blanquecinas o amarillas (el tejido de la hoja es tan fino que es casi transparente), enanismo y con frecuencia la muerte. Los frutos formados después de la infección pueden ser cosechados; no obstante la mayoría de las plantas infectadas producen numerosas flores pero no producen frutos (Brown, 1991).

El complejo viral SLCL/WCMoV causa enrollamiento severo en la sandía. Los síntomas incluyen enrollamiento severo, moteado, florecimiento prolífico, enanismo y moteado en el fruto. No hay desarrollo completo del fruto si la infección ocurre a una edad fisiológica temprana (Brown, 1991).

#### b) Enfermedades de la okra (*Abelmoschus esculentus*)

El virus de enrollamiento de la hoja de la okra (OLCV) provoca engrosamiento de las venas, enrollamiento de las hojas, enanismo y una reducción en la producción. Estos síntomas varían según la variedad de la okra. En Guatemala, en donde es un cultivo de exportación importante, la enfermedad puede afectar a un 100% de las plantas, y aquellas infectadas en un estadio temprano no producen frutos. Hasta la fecha no se conocen variedades resistentes (Brown, 1991).

#### c) Enfermedades de las leguminosas

Alrededor del mundo se han reportado epidemias a niveles críticos debido a que las leguminosas son consumidas por casi todas las culturas basadas en la agricultura como una fuente importante de proteína vegetal. Se ha encontrado que, tanto las leguminosas cultivadas como las silvestres, sirven como hospederos universales de *B. tabaci*. Hay dos tipos de enfermedades causadas por geminivirus en las leguminosas: las enfermedades que muestran síntomas del tipo del mosaico dorado y que se denominan enfermedades del mosaico dorado del frijol, y las que

muestran síntomas de enrollamiento y enanismo severo, las cuales se denominan enfermedades del enanismo del frijol (Brown, 1991).

d) Enfermedades de las solanáceas

A principios de 1984, las enfermedades causadas por los geminivirus transmitidos por mosca blanca en chile, tabaco y tomate se dispersaron a lo largo de la región sur de Estados Unidos, México, el Caribe y América Central (Belice, Costa Rica, Guatemala, Nicaragua y Panamá). Los síntomas de esta enfermedad incluyen ya sea enrollamiento de las hojas, un mosaico amarillo o dorado o un enrollamiento con hojas amarillas, así como enanismo leve o severo, pérdidas debido a la baja producción y una calidad del fruto reducida. Las plantas jóvenes de tomate y chile infectadas no producen frutos, mientras que las plantas maduras infectadas frecuentemente producen abundantes flores pero pocos frutos (Brown, 1991).

3. Transmisión de geminivirus por el vector *Bemisa tabaci* (Gennadius)

Los geminivirus son transmitidos de planta a planta por los cicadélidos y mosca blanca. Tienen la capacidad de persistir en los insectos vectores por varios días o hasta por toda la vida del insecto. No obstante, no se replican en sus vectores. Muchos de estos virus no pueden ser manualmente transmitidos, y algunos están restringidos a las células asociadas al floema en el sistema vascular de la planta (Fields, 1996).

La habilidad de la mosca blanca para interactuar exitosamente con la planta hospedera durante la alimentación y reproducción es esencial en la transmisión de los geminivirus. Estos virus son transmitidos en una manera persistente por el vector. La mayoría de los virus pueden ser transmitidos empleando una ingesta de acceso de 24 horas seguido por una ingesta de inoculación de 48 horas con un tiempo de latencia intermedio de 12 horas, aproximadamente. Se cree que los viriones pasan a través de los estiletes y el intestino medio hacia el intestino posterior donde cruzan la membrana plasmática hacia el hemocelo por endocitosis. A partir de allí, probablemente se muevan a través de la hemolinfa y lleguen a la glándula salival accesoria en

donde luego son transmitidos hacia la planta hospedera a través de la saliva inyectada por la mosca blanca mientras ésta se alimenta (Brown, 1991).

La replicación y transcripción de los geminivirus ocurre en el núcleo de las células infectadas. La transcripción ocurre en ambas hebras del ADN genómico. Los miembros del subgrupo I pueden usar mecanismos de edición para producir la proteína de fusión involucrada en la replicación la cual ocurre mediante el mecanismo del círculo rodante en el núcleo de las células infectadas (Fields, 1996).

#### 4. Diagnóstico y detección:

En el pasado, el diagnóstico exacto de los virus involucrados en estas enfermedades no era posible. Tradicionalmente, los métodos serológicos eran los medios principales para la detección y diagnóstico del virus. Este acercamiento tenía un éxito limitado con los virus transmitidos por mosca blanca debido a que eran extremadamente difíciles de purificar. Algunos sueros policlonales producían reactividad cruzada por antígenos heterólogos, mientras que se observaba reactividad cruzada con geminivirus cercana o distantemente relacionados al emplear anticuerpos monoclonales (Green, 1994).

El uso de plantas indicadoras ha sido otra técnica de detección y diagnóstico de virus vegetales. Sin embargo; en el caso de los geminivirus no ha sido muy utilizada por dos limitantes principales. Primero, la transmisión mecánica del geminivirus no es fácil y segundo, el establecimiento de colonias de *B. tabaci* es bastante complicada (Morales, 1995).

##### a) Técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica empleada para amplificar un número de copias de una región específica de ADN, y así producir suficiente ADN que pueda ser estudiado adecuadamente (Brown, 1995). Puede ser usada para aislar fragmentos de ADN, marcar ADN, clonar ADN copia y ADN genómico, secuenciar ADN, mutar secuencias específicas de ADN, alterar promotores y cuantificar la cantidad de ADN o ARN (Hoy, 1994). Una gran ventaja

de esta técnica es que se necesitan pequeñas cantidades de material inicial para poder secuenciar individuos pequeños y muestras degradadas (Simon, 1994). Para usar el PCR, es necesario conocer las secuencias exactas que flanquean ambos extremos de la región de interés en el ADN (puede ser un gen o una secuencia). No es necesario conocer la secuencia de ADN intermedia (Brown, 1995). Este tipo de amplificación de ADN es geométrica, produciendo grandes cantidades de secuencias específicas de ADN adecuadas para secuenciación, clonación o preparación de sondas (Hoy, 1994).

El poder del PCR para amplificar ADN es dramático; teóricamente hasta una molécula puede ser amplificada para producir una cantidad de copias. No obstante, este poder crea una variedad de problemas con contaminación y requiere de una planeación cuidadosa de los experimentos de PCR y el uso de controles adecuados (Hoy, 1994).

El PCR involucra la combinación de una muestra de ADN con oligonucleótidos iniciadores, deoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) y una ADN polimerasa en una solución amortiguadora (Hoy, 1994). Esta técnica consta de tres pasos: (a) desnaturalización de la doble hebra de ADN por calentamiento; (b) unión de secuencias iniciadoras (imprimadores) a sitios flanqueando la región a ser amplificada; y (c) extensión del cebador, en el cual las hebras complementarias a la región entre los imprimadores son sintetizados bajo la influencia de una ADN polimerasa (Taq) la cual es termoestable. Los productos son procesados repetidamente a través de los pasos (a)-(c) (Awise, 1994). Debido a que los productos de una ronda de amplificación sirven como moldes para el próximo, cada ciclo sucesivo esencialmente duplica la cantidad del producto de ADN deseado. El principal producto de esta reacción exponencial es un segmento de ADN de doble hebra cuyo extremo está definido por el extremo 5' del cebador y cuya longitud está definida por la distancia entre los imprimadores (Sambrooks, 1989).

Los primeros ciclos del PCR son particularmente críticos para la amplificación eficiente y precisa de las secuencias de ADN. Todos los ciclos comienzan con la desnaturalización de la hebra molde de ADN para que de esta forma se tenga una hebra simple de ADN. A medida que la temperatura es disminuida, los imprimadores se unen a las secuencias complementarias del molde de ADN. La unión del imprimador en los primeros ciclos requiere que éstos rastreen el

molde de ADN para encontrar las secuencias correctas a las cuales se unirán. Debido a que mucho del ADN no tendrá la secuencia correcta, la unión en los primeros ciclos puede no ser del todo específica como en los ciclos intermedios. En los primeros ciclos, las interacciones de los imprimadores con el molde de ADN puede producir productos inespecíficos. El PCR únicamente será específico si los dos imprimadores se unen a sitios en la banda complementaria del ADN y éstos sitios están a menos de 10 kb de distancia (Hoy, 1994).

Durante los ciclos intermedios, el producto previamente sintetizado es preferido como molde por los imprimadores, por lo que el molde blanco está perfectamente demarcado. Finalmente, en los ciclos tardíos, los productos amplificados que se encuentran en altas concentraciones se hibridarán con ellos mismos, bloqueando los sitios complementarios de los imprimadores. Se pueden sintetizar secuencias de ADN de hasta 10 kb, no obstante, es más difícil de obtener secuencias de 2 kb (Hoy, 1994).

Entre los componentes de la reacción PCR se encuentran:

i) Secuencias iniciadoras (“imprimadores”)

Los imprimadores son oligonucleótidos que tienen diferentes secuencias y son complementarios a las secuencias encontradas en las hebras opuestas del molde de ADN; flanquean el segmento de ADN a ser amplificado (Sambrooks, 1989). Los imprimadores determinan la longitud, especificidad, y naturaleza del ADN amplificado producido por el PCR. La extensión del ADN ocurre en el OH del extremo 3' del cebador para que los extremos del ADN amplificado son definidos por los extremos 5' de los imprimadores. La longitud del ADN generado durante el PCR es igual a la suma de las longitudes de los dos imprimadores más la distancia en el molde de ADN localizada entre los imprimadores (Hoy, 1994).

Los imprimadores deben ser de por lo menos 16 nucleótidos y preferiblemente de 20-24 nucleótidos de longitud. Generalmente, se emplean en concentraciones de 1  $\mu$ M en las reacciones de PCR. Esto generalmente es suficiente para por lo menos 30 ciclos de amplificación. La presencia de mayores concentraciones de oligonucleótidos pueden causar iniciación en sitios

ectópicos, con la consecuente amplificación de secuencias no deseadas. Inversamente, la reacción de PCR es ineficiente cuando la concentración de imprimadores es limitada. (Sambrooks, 1989)

ii) Taq ADN polimerasa

La enzima encargada de catalizar esta reacción es una ADN polimerasa termoestable purificada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (Taq ADN polimerasa). Esta enzima, la cual resiste la incubación prolongada a 95°C, no es inactivada por el paso de desnaturalización con calor y no necesita ser reemplazada en cada ronda del ciclo de amplificación (Sambrooks, 1989). La Taq ADN polimerasa es una proteína de 94 kDa con un óptimo de temperatura de aproximadamente 75-80°C. Puede amplificar más de 60 nucleótidos por segundo a 70 °C con un primer de 30 oligómeros. En la mezcla de PCR, la Taq ADN polimerasa retiene 50% de su actividad después de 40 minutos a 95°C (Hoy, 1994).

Existen dos formas de Taq ADN polimerasa: la enzima nativa purificada a partir de la *Thermus aquaticus* y la forma obtenida por ingeniería genética de la enzima sintetizada en *E. coli*. Ambas formas poseen una actividad de exonucleasa dependiente de la polimerización en una dirección 5' →3', pero carecen de la actividad de exonucleasa en dirección 3'→5'. Se requieren aproximadamente 2 unidades de enzima para catalizar la reacción de PCR típica. La adición de un exceso de enzima puede llevar a la amplificación de secuencias no deseadas (Sambrooks, 1989).

iv) Deoxiribonucleósidos trifosfatados (dNTP's):

Estos compuestos forman la nueva hebra que está siendo sintetizada. Los dNTP's son usados en concentraciones saturadoras de 200 μM para cada dNTP (Sambrooks, 1989).

v) Soluciones amortiguadoras:

La solución amortiguadora estándar usada para estas reacciones contiene KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8.3) y MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM. Cuando hay una incubación a 72°C, el pH de la reacción disminuye por más de una unidad, produciendo una solución amortiguadora cuyo pH es de aproximadamente 7.2. La presencia de estos cationes divalentes es crítica (Sambrooks, 1989).

b) Diagnóstico por PCR:

Por muchos años, el diagnóstico de la enfermedad se ha respaldado principalmente en la observación de los síntomas típicos de la enfermedad. En algunos casos, se ha usado la visualización de cuerpos de inclusión con microscopía de luz y/o localización ultraestructural de los viriones usando espectroscopía electrónica. Ninguna de estas técnicas son específicas y no pueden ser utilizadas para diferenciar entre los geminivirus transmitidos por mosca blanca. No obstante, el surgimiento de nuevas técnicas ha hecho posible el desarrollo de pruebas que usan ácidos nucleicos para detectar e identificar con precisión estos virus (Green, 1994).

Entre estas técnicas de detección y diagnóstico se encuentra la técnica de hibridación de ácidos nucleicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta última permite clonar y secuenciar el ADN obtenido para así comparar su homología con el mismo segmento de otros geminivirus ya secuenciados. También, el hecho de haber sido amplificado un segmento de ADN, indica que se tiene un geminivirus en la planta investigada, pues las secuencias iniciadoras son específicas para una secuencia común a varios geminivirus investigados (Morales, 1995).

Durante la multiplicación viral los geminivirus producen naturalmente una molécula intermedia circular de ADN de doble banda, que se utiliza *in vitro* como molde para la amplificación por PCR. Secuencias virales altamente conservadas dentro de los diferentes geminivirus se pueden identificar utilizando imprimadores degenerados para el PCR. Estos iniciadores degenerados se han usado para amplificar fragmentos de ADN viral proveniente de geminivirus que infectan tomate, frijol, yuca, melón, chile y malezas en todo el mundo. Una vez se han producido por PCR, fragmentos de ADN, éstos se pueden utilizar para análisis con enzimas de restricción (RFLP), hibridación y secuenciación de ADN (Ramírez, 1995).

Se emplearán imprimadores que amplifican un fragmento de una secuencia que codifica para la proteína de cobertura del virus y que se encuentra en el ADN-A

c) PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism):

En este tipo de análisis, la secuencia blanco es amplificada por el PCR del ADN genómico. El producto de PCR es luego desnaturizado y separado por electroforesis en gel de acrilamida, en donde las mutaciones son detectadas como movilidad alterada de hebras simples separadas (Hayasi, 1991).

La movilidad electroforética de la partícula en el gel es sensible a ambos tamaño y forma. En condiciones no desnaturizantes, el ADN de hebra simple tiene una estructura doblada que está determinada por las interacciones intramoleculares, y por consiguiente, por su secuencia. En los análisis de SSCP, una secuencia mutada es detectada como un cambio en la movilidad en la electroforesis en gel de poliacrilamida causada por su estructura alterada. Se ha encontrado que debido a su alto poder de resolución, la electroforesis en gel de poliacrilamida puede distinguir casi todas los cambios conformacionales causados por diferencias sutiles en las secuencias en un fragmento de varios cientos de bases (Hayasi, 1991).

En el análisis de PCR-SSCP, es posible detectar cambios en secuencias de varios cientos de bases, en contraste con otras técnicas en las cuales los cambios en secuencias relativamente cortas (unas cuantas hasta 20 bases) son detectadas. El análisis PCR-SSCP es más sensible a errores de replicación que ocurren durante el PCR (Hayasi, 1991).

i) Tinción en plata:

La introducción de la tinción con plata de proteínas, ARN y ADN en geles de poliacrilamida ha sido un gran avance en la detección de estos compuestos. Una posibilidad poderosa para la tinción ultrasensible de las proteínas y los ácidos nucleicos en un rango de nanogramos es la reducción química específica de los iones de plata, cuya sensibilidad es únicamente superada por el marcaje radioactivo (Blum, 1987).

Dos fenómenos principales ocurren en la formación de imagen en este tipo de tinción. El primero; es la clave en los procesos fotográficos, es la reducción autocatalítica de la plata. Esto significa que la reducción del ión de plata a plata metálica es significativamente aumentada cuando hay presente algo de plata metálica. Cuando este fenómeno se aplica a la formación de imágenes en la tinción con plata, significa que la imagen aparecerá en los lugares donde la reducción comienza, debido a que aquí el crecimiento de la imagen es mucho mayor que en cualquier otro lugar. El segundo principio es que, mientras más fuerte sea el complejo formado entre el ion de plata y la molécula, menos reactivo será el ion de plata (Rabilloud, 1994).

### III. OBJETIVOS E HIPOTESIS

#### A. OBJETIVOS:

##### 1. General:

1. Detectar la presencia y determinar la variabilidad genética de los geminivirus transmitidos por *B.tabaci* en cultivos de las regiones sur y oriental de Guatemala por medio del análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando para ello imprimadores específicos.

##### 2. Específicos:

1. Detectar la presencia de geminivirus transmitidos por *B.tabaci* en los distintos agrosistemas de las regiones sur y oriental de Guatemala, empleando para ello la técnica de PCR con imprimadores específicos.
2. Identificar algunos hospederos de *B.tabaci*, así como de geminivirus, en cultivos de las regiones sur y oriental de Guatemala, tales como solanáceas, cucurbitáceas y leguminosas.
3. Determinar la diversidad genética de los diferentes geminivirus transmitidos por *B.tabaci* presentes en los cultivos de las regiones oriental y sur de Guatemala.
4. Evaluar la relación existente entre la presencia de geminivirus y diversos factores tales como cultivo, biotipo de *B.tabaci* que lo transmite, altura y región en la que se encuentran los cultivos que infecta.

B. HIPOTESIS:

1. Existen diferentes tipos de geminivirus transmitidos por *B.tabaci* en cultivos de las regiones sur y oriental de Guatemala.
2. La presencia de geminivirus depende de la altitud y la región en la que se encuentran los cultivos que infecta.
3. Es posible detectar la presencia de geminivirus en especímenes de *Bemisia tabaci* empleando los imprimadores degenerados 514 y 1048 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## VI. MATERIALES Y METODOS

### A. METODOLOGIA:

#### 1. Captura de especímenes:

Se efectuaron muestreos en las regiones sur; en los departamentos de Escuintla y Retalhuleu; y en la región oriental, en los departamentos de Zacapa, Jutiapa, Jalapa y El Progreso. Las capturas se hicieron en plantas escogidas pertenecientes a los géneros solanáceas, cucurbitáceas, leguminosas y a la familia de la okra. Las colectas se realizaron en dos épocas: antes de la época lluviosa (marzo y abril de 1998) y después de las lluvias (noviembre y diciembre de 1998).

Se analizaron 732 especímenes de adultos de *Bemisia tabaci*, los cuales fueron colocados en viales rotulados luego de ser capturados. La captura se efectuó empleando aspiradores, colectando especímenes en las plantas de interés. Posteriormente algunos individuos se almacenaron en nitrógeno líquido y otros en etanol al 95%, esto se hizo inmediatamente después de hacer la colecta en la plantación donde se encontraba alguno de los cultivos a estudiar. Las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido en el laboratorio en la ciudad de Guatemala hasta su análisis posterior.

Se anotó la sintomatología que presentaban los cultivos (enanismo, clorosis, moteado y enrollamiento de las hojas) en donde se colectaron las muestras. Además se anotó la altitud, longitud, latitud y localización geográfica de las localidades en donde se efectuaron las colectas.

## 2. Detección de geminivirus empleando proteína de cobertura e imprimadores 514 y 1048

### 2.1 Lisis de la muestra:

Todo el procedimiento de lisis de la muestra se realiza en frío. Primero se clasifican y separan los especímenes hembras de *B.tabaci*, separando la cabeza del abdomen. La clasificación de acuerdo a la especie se basa en la observación visual de la forma del ocelo del insecto, la cual varía de acuerdo a la especie de mosca blanca. Para determinar el sexo de la mosca blanca, se observa el extremo inferior del abdomen, en donde al observarse un apéndice en forma de gancho, se concluye que es un espécimen macho. En caso de no tener suficientes hembras disponibles, se toman los machos. Se separa el tórax del abdomen con un estilete y el abdomen de la mosca blanca se macera (empleando un mácerador eppendorf estéril sobre una caja petri forrada con parafilm) en 10 ul de solución amortiguadora de lisis y luego de haber sido maceradas, se agregan otros 20 ul de la misma solución. Se transfiere el volumen total a un tubo de microcentrífuga de 0.5 ml y se coloca en hielo hasta que se incuban. Las muestras se incuban a 65°C por 15 minutos y luego 10 minutos a 95°C.

### 2.2 Amplificación del ADN:

Se prepara la mezcla de reacción para el total de muestras que se van a analizar. Utilizar las cantidades de reactivos y el programa de amplificación especificados en el apéndice A. Se colocan 25 µl de la mezcla de reacción y se ponen en el termociclador dejando correr el programa de amplificación (el programa se describe en el apéndice A). Los productos de PCR obtenidos se guardan de preferencia a -20°C, pero también pueden almacenarse a 4°C.

### 2.3 Detección de productos de PCR:

Se prepara el gel de agarosa al 0.8% (Ver apéndice A). El gel se carga con 6 µl de muestra más 2 µl de solución amortiguadora de carga. Se corre la electroforesis a 80 V en gel de agarosa al 0.8 % y se emplea como solución amortiguadora de cámara el solución amortiguadora TAE 1x.

Se saca el gel y se coloca en la solución de tinción de bromuro de etidio (0.05 mg/ml) por 5 minutos. El gel se transfiere a un recipiente con agua destilada para que se destiña por 15 minutos. Se toma la fotografía del gel y se identifican las muestras positivas, las cuales muestran una banda de aproximadamente 400 bp.

A las muestras que resultaron positivas se les efectúa un análisis de SSCP (single strand conformation polymorphism) para determinar si existen polimorfismos entre ellas.

### 3. SSCP (Single strand polymorphism):

#### 3.1 Preparación del gel:

Preparar un gel de acrilamida al 8% (ver receta en apéndice A) y dejar polimerizar.

#### 3.2 Cargar el gel:

Se colocan 2  $\mu$ l de producto de PCR y 9  $\mu$ l de solución amortiguadora de carga desnaturizante en un tubo eppendorff y se mezclan. Los tubos se calientan a 95°C por tres minutos y se sacan inmediatamente para colocarlos en hielo. Las muestras se mantienen en hielo por lo menos 5 minutos. Se toman 4 $\mu$ l de la muestra y se cargan en el gel SSCP.

#### 3.3 Corrida del gel SSCP:

La electroforesis se lleva a cabo a un voltaje máximo, 20 miliamperios y a 4°C. Se emplea como solución amortiguadora de cámara TBE 0.5X (receta en apéndice A). Dejar que corra hasta que ambas bandas de colorante (azul de bromofenol y xilen-cianol) se salgan del gel.

#### 3.4 Tinción de plata de los geles de SSCP:

Se remueven los geles de las placas de vidrio y se colocan en un recipiente con 200 ml de ácido acético al 10% (receta en apéndice A). El gel puede almacenarse indefinidamente en esta solución antes de proceder al siguiente paso. El gel se lava cuatro veces en 250 ml de agua doblemente destilada con dos minutos de agitación por lavado. Luego se transfiere a 200 ml de solución de coloración de nitrato de plata y se agita por 30 minutos.

El gel se remueve de la solución de nitrato de plata, se escurre y se lava con agua destilada por no más de 20 segundos. Luego se agregan 250 ml de solución reveladora (justo antes de agregarla, se le adicionan 300 ul de formaldehído al 37% y 2 ul de solución de tiosulfato de sodio). El gel se coloca en la solución reveladora de carbonato de sodio fría y se agita. Tan pronto como las bandas aparezcan (usualmente de 4-6 minutos), agregar la solución fijadora del primer paso y agitar hasta que las burbujas desaparezcan. Lavar el gel dos veces con agua destilada.

Los geles se colocan sobre un papel filtro, luego se cubren con acetato y se ponen a secar por 1 hora en el secador de geles.

#### 4. Análisis Estadístico de los resultados:

Para analizar estadísticamente los resultados, se efectuó un análisis de varianza utilizando tablas de contingencia por medio del programa estadístico SPSS. Los datos se agruparon de acuerdo a la región, altitud, cultivo y época en donde se realizaron las colectas. También se clasificaron de acuerdo al biotipo de *Bemisia tabaci* al que pertenecían. Con este análisis se pudo determinar si existía relación entre las variables que se enumeraron anteriormente.

B. MATERIALES: Ver apéndice B

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### A. MUESTRAS ANALIZADAS

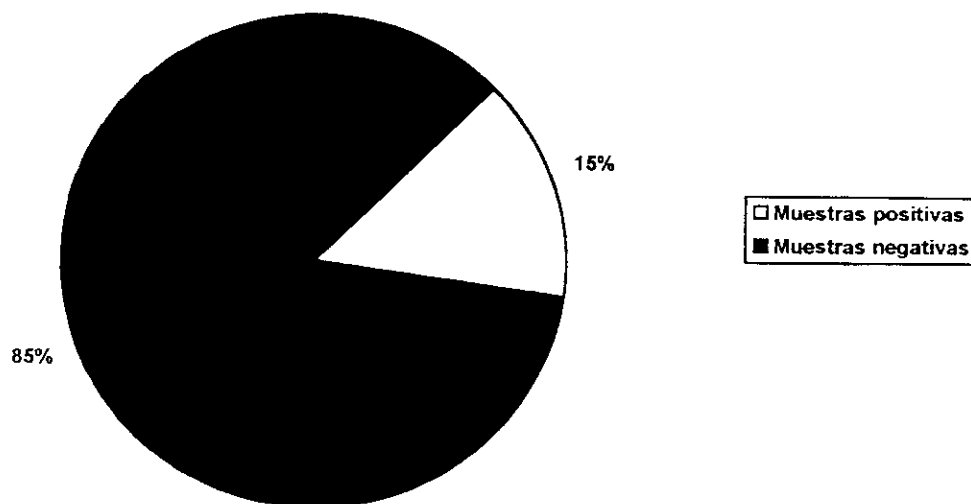
Se analizaron 732 especímenes de *B.tabaci* provenientes de dos colectas realizadas durante los meses de marzo a abril de 1998 y de noviembre a diciembre de 1998. Estos especímenes fueron colectados en plantaciones de tabaco, tomate, frijol, chile y cucúrbitas en general; situados en varias localidades de los departamentos Escuintla y Mazatenango en la región sur; y en los departamentos de El Progreso, Jutiapa, Jalapa y Zacapa en el oriente de Guatemala.

### B. DETECCION DE GEMINIVIRUS POR PCR

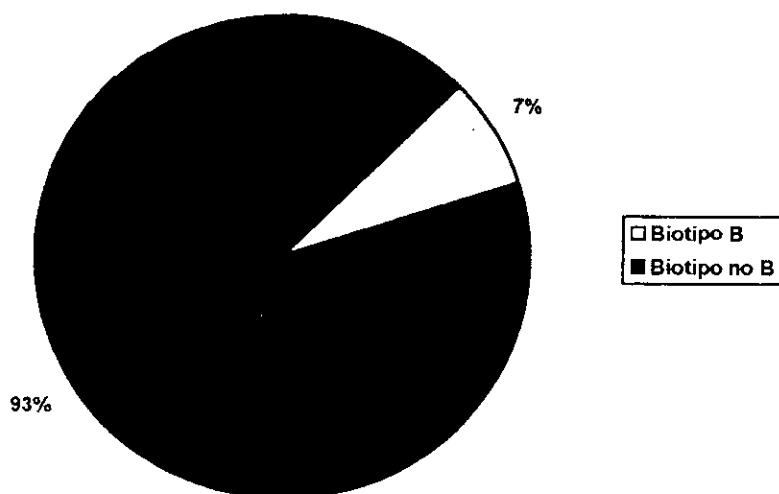
De las 732 muestras analizadas por medio del diagnóstico con PCR, 108 muestras resultaron positivas para geminivirus, lo que representa un 15% del total de las muestras analizadas (gráfica 1). De estas 108 muestras, 8 fueron detectadas en individuos de *B.tabaci* pertenecientes al biotipo B, representando un 7% del total de las muestras positivas, mientras que el resto fue detectado en especímenes de *B.tabaci* biotipo no B (gráfica 2). Se efectuó un análisis de varianza para determinar la relación entre la presencia de geminivirus y el biotipo de *B.tabaci* que lo transmite. Se determinó que las muestras positivas y negativas se distribuyen más o menos con la misma frecuencia entre los distintos biotipos de *Bemisia tabaci*. Al considerar únicamente los casos positivos para geminivirus, se concluyó que la frecuencia con la que aparece el virus no es la misma para todos los biotipos, indicando que los geminivirus tienen preferencias por ciertos biotipos. Se obtuvo un grado de significancia de F de 0.005, lo que indica que esta diferencia es altamente significativa.

A pesar de que el biotipo B de *Bemisia tabaci* es el más agresivo de todos los biotipos, ya que infesta un rango mayor de cultivos, se esperaría que la presencia de geminivirus fuera mayor en este biotipo, pero sólo se detectó un pequeño porcentaje de geminivirus en los especímenes de *Bemisia tabaci* del biotipo B.

Gráfica 1: Porcentaje de muestras positivas para geminivirus



Gráfica 2: Distribución de geminivirus según biotipo de *Bemisia tabaci*

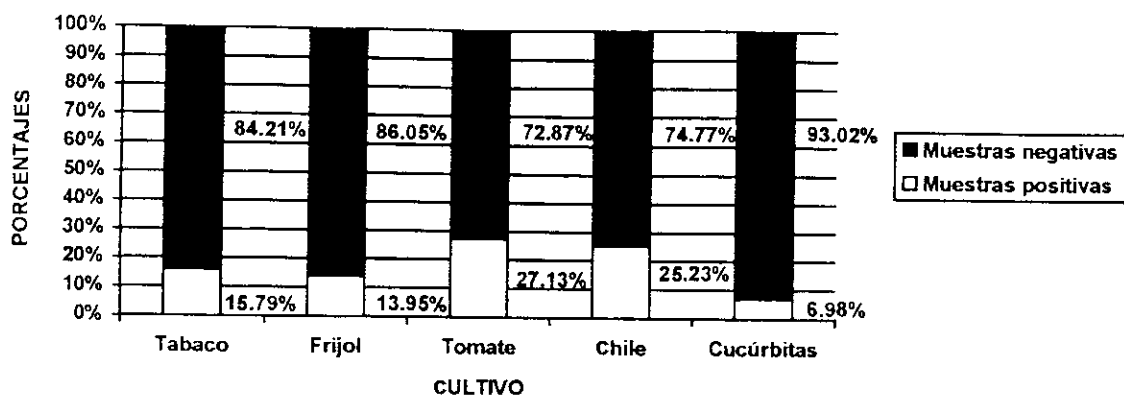


La distribución de muestras positivas para geminivirus según el cultivo en el que se hicieron las colectas de mosca blanca se muestra en la gráfica 3. Se determinó que de 76 especímenes de mosca blanca analizados, colectados en plantaciones de tabaco, 12 muestras resultaron positivas, lo cual representa un 15.79% del total de las muestras de tabaco. De 119 muestras analizadas para el tomate, 33 fueron positivas, representando un 27.13%. De la misma forma, de las 107 muestras analizadas para el chile, 27 resultaron positivas, lo que equivale a un 25.23% de las muestras de chile. De 86 muestras de frijol analizadas, 12 dieron un resultado positivo, equivalente a un 13.95% y finalmente, de los 344 especímenes de mosca blanca colectados en plantaciones de cucúrbitas en general, 24 resultaron positivas para geminivirus, lo que equivale a un 6.98% de las muestras totales de cucúrbitas.

A partir de los resultados anteriores, se observa que el porcentaje de individuos portadores de geminivirus que fueron colectados en plantaciones de tomate y chile (ambos pertenecientes a la familia de las solanáceas) es mayor que los de los demás cultivos; lo que podría llevar a concluir que los cultivos de tomate y chile son más propensos a ser infectados por geminivirus. Una posible explicación a este fenómeno es que los miembros de la familia de las solanáceas proveen condiciones más favorables para el desarrollo y supervivencia del virus. De la misma forma, se notó que los especímenes de *B.tabaci* colectados en cucúrbitas, presentan la menor proporción de individuos portadores del virus.

Se determinó por medio del análisis estadístico en SPSS que las muestras positivas y negativas se distribuyen de forma similar en los cultivos estudiados. Pero, cuando se consideraron únicamente los casos positivos, se observó que sí existían preferencias hacia ciertos cultivos ya que las frecuencias con las que aparece el virus no son las mismas para todos. Se observó que los cultivos de tomate son los que presentan el mayor porcentaje de muestras positivas para geminivirus. La significancia resultante fue de 0.025 lo que indica que esta diferencia es significativa.

Gráfica 3: Distribución de geminivirus según cultivo

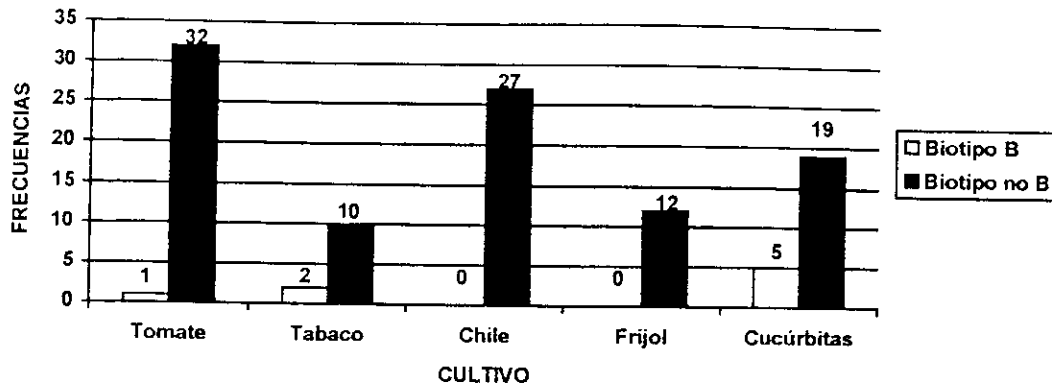


En la gráfica 4, se observa la distribución de geminivirus según biotipo de *Bemisia tabaci* en los diferentes cultivos. En el análisis de varianza, se obtuvo un grado de significancia de 0.23, lo que indica que la manera en que se distribuyen las muestras positivas y negativas es casi la misma entre los biotipos de *Bemisia tabaci* colectados en los cultivos estudiados. Lo que significa que, en este caso en particular, en todos los cultivos siempre se encontraron más muestras negativas que positivas, en ningún caso, el porcentaje de muestras positivas era mayor que el número de muestras negativas.

En los cultivos de chile y frijol no se detectaron muestras positivas de geminivirus en especímenes de mosca blanca biotipo B. Mientras que, en los cultivos de cucúrbitas fue en donde se detectó el mayor porcentaje de geminivirus en *Bemisia tabaci* biotipo B. Esto podría indicar que los distintos biotipos de *Bemisia tabaci* tienen ciertas preferencias hacia algunos cultivos y que el biotipo B tiene una menor capacidad de infección que los otros biotipos de mosca blanca. Al parecer, el biotipo B tiene mayor predilección por los cultivos de cucúrbitas, pero éstos a su vez presentan los menores porcentajes de geminivirus.

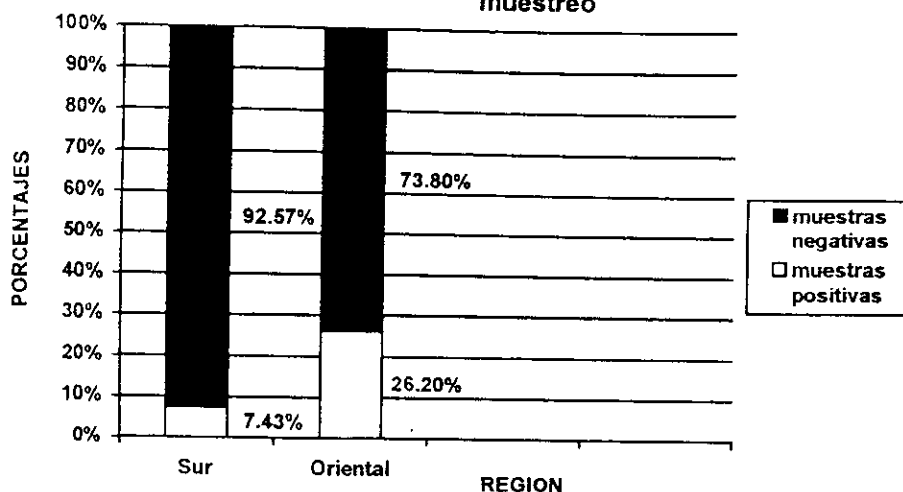
Para confirmar la hipótesis anterior, se hizo un análisis de varianza el cual indicó que la distribución de geminivirus no es equitativa en todos los biotipos en los cultivos estudiados, y que efectivamente sí existen ciertas preferencias del geminivirus hacia los biotipos que lo transmiten y el cultivo que infecta.

Gráfica 4: Distribución de geminivirus según biotipo de *Bemisia tabaci* en diferentes cultivos

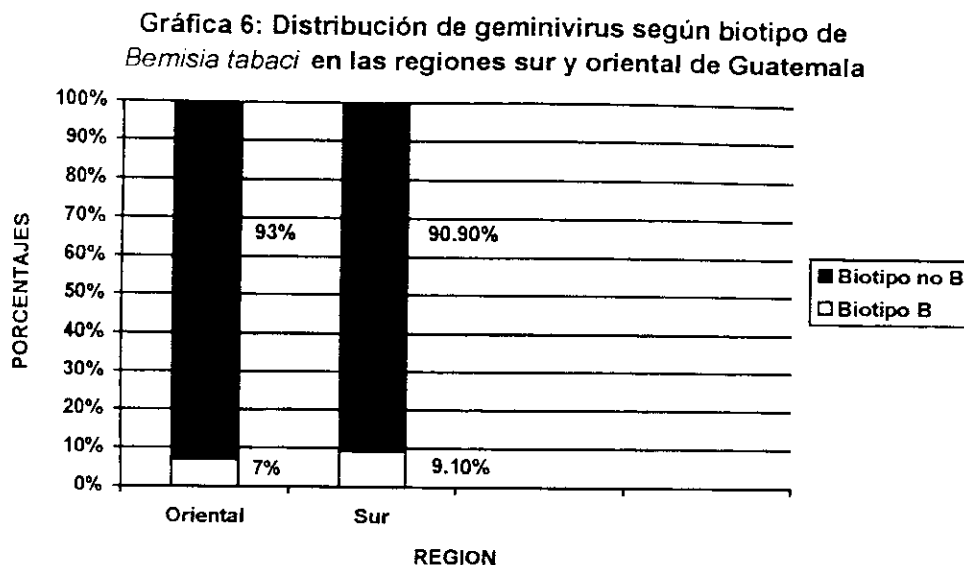


En la gráfica 5, se observa la distribución de geminivirus de acuerdo a la región de muestreo. Al parecer, las muestras positivas y negativas se distribuyen con distinta frecuencia en ambas regiones, pero al efectuar el análisis de varianza, se obtuvo que la distribución de muestras positivas y negativas en ambas regiones es similar (significancia de 0.941). Lo que significa que, estadísticamente, las proporciones entre muestras positivas y negativas son muy parecidas en ambas regiones. Siempre se tiene un número mayor de muestras negativas que de muestras positivas sin importar la región. Debido a que ambas regiones están aisladas geográficamente y tienen diferentes condiciones climáticas, se puede pensar que estas variaciones podrían ser relevantes para la supervivencia y adaptación del geminivirus, pero se observó que no hay preferencias por parte del virus para infectar los cultivos que se encuentran en las dos regiones.

Gráfica 5: Distribución de geminivirus de acuerdo a región de muestreo



La gráfica 6 ilustra la distribución de los geminivirus según el biotipo de *Bemisia tabaci* en ambas regiones de estudio. Aunque en la región oriental hay un mayor número de muestras positivas para geminivirus, la proporción de muestras positivas para geminivirus transmitidas por el biotipo B no es tan diferente para el sur (1/10) como lo es para el oriente (1/13). Esto se ve confirmado con el análisis de varianza, el cual indica que no hay preferencias por el biotipo de *Bemisia tabaci* en ambas regiones. Lo que significa que el geminivirus está distribuido casi con la misma frecuencia en los biotipos de *B. tabaci*, tanto en el sur como en el oriente.

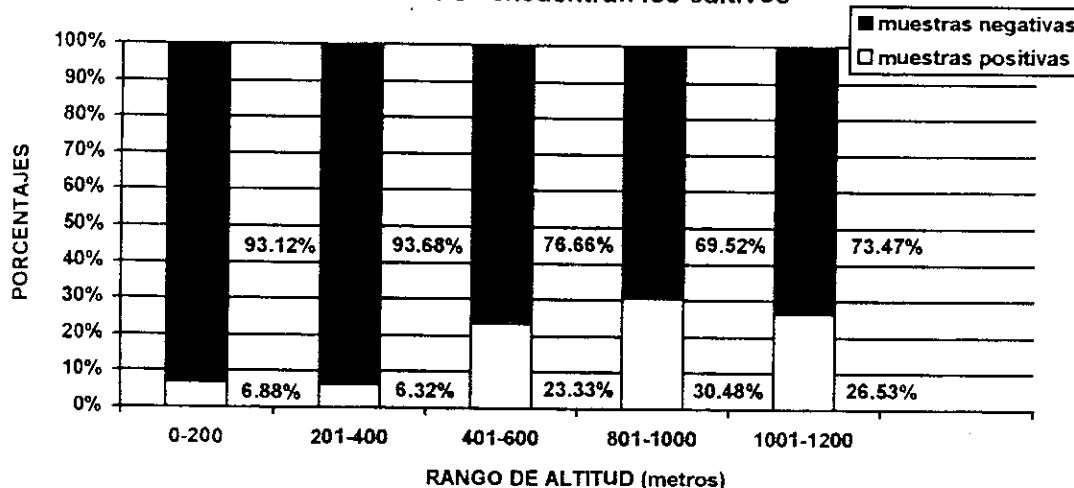


La gráfica 7 muestra la distribución de geminivirus de acuerdo a la altitud a la que se encuentran los cultivos en donde se colectaron las muestras. Se observó que el rango de altitudes de los 801 a los 1000 metros sobre el nivel del mar es el que mayor porcentaje de muestras positivas presenta. Luego le sigue el rango de los 1001-1200 metros sobre el nivel del mar. En el rango de altitudes de 801-1000 metros, se encuentran varias localidades correspondientes al departamento de Jalapa en la región oriental, mientras que en el rango de los 201-400 metros, están situadas las varias localidades que fueron estudiadas en los departamentos de Escuintla y Mazatenango. Esto podría indicar que existen preferencias por parte de la mosca blanca por ciertos rangos de altitudes. Se debe considerar un factor muy importante y es que los cultivos estudiados no pueden ser cultivados en todos los rangos de altitudes y es por esto que posiblemente algunas altitudes posean mayores porcentajes de virus.

La distribución de geminivirus según altitud se pudo ver afectada por el tipo de muestreo que se efectuó, ya que no se tomó un número fijo de localidades de muestreo para cada rango de altitudes. Además, no se tomaron muestras en localidades situadas entre los 601 y los 800 metros, ya que en estas altitudes no se encontraron cultivos de interés. Este sesgo se debe tomar en consideración a la hora de interpretar los datos estadísticos que se efectuaron con el análisis de varianza en el programa estadístico SPSS.

Al efectuar el análisis de varianza éste reveló que la distribución de geminivirus no es equitativa entre los rangos de altitudes, esta diferencia es significativa (significancia de 0.022). Lo que indica que las proporciones entre muestras positivas y negativas para geminivirus no son iguales en los rangos estudiados. Además, cuando se consideran sólo los casos positivos para geminivirus, se observó que éstos no se distribuyen de igual forma, lo cual indica que sí hay preferencia por ciertos rangos de altitudes. Esta preferencia también es significativa (significancia de 0.018).

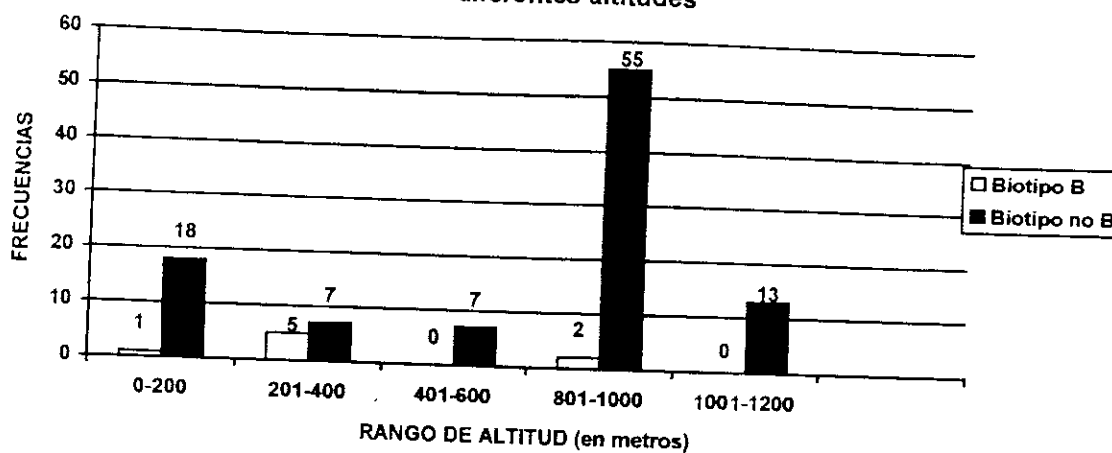
**Gráfica 7: Distribución de geminivirus según altitud en donde se encuentran los cultivos**



La gráfica a continuación muestra la distribución de geminivirus según el biotipo de *Bemisia tabaci* a diferentes altitudes. Se observa claramente que las regiones situadas entre los 201 a los 400 metros sobre el nivel del mar son las que presentan el mayor número de muestras positivas de geminivirus transmitidas por el biotipo B. En los rangos de altitudes de los 0-200 metros y de los 801-1000 metros se detectó geminivirus en biotipo B, pero es un número demasiado pequeño en relación del número de muestras positivas totales.

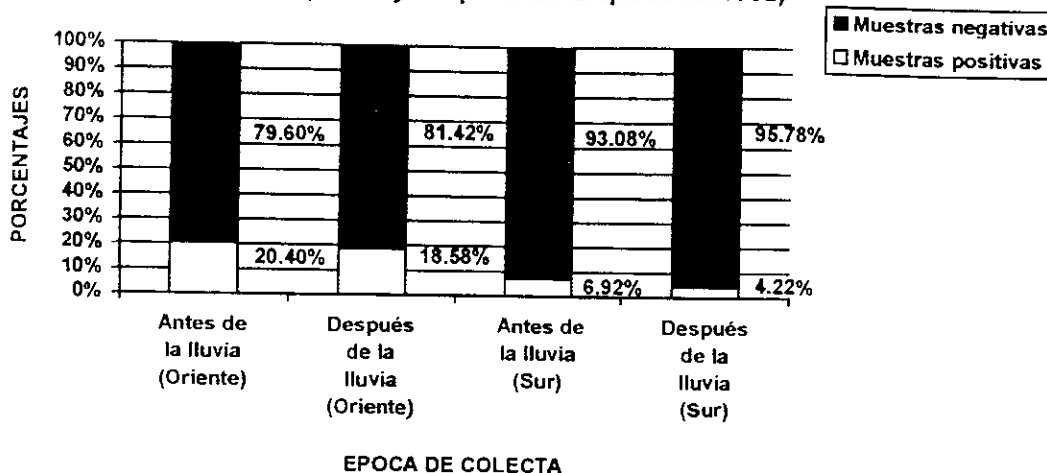
El análisis de varianza indicó que la distribución de geminivirus según biotipo de *B. tabaci* en los distintos rangos de altitudes es casi la misma, pero se debe tomar en consideración el factor de la toma de muestras.

Gráfica 8: Distribución de geminivirus según biotipo de *Bemisia tabaci* a diferentes altitudes



La gráfica 9 muestra la distribución de geminivirus según la época en que se efectuaron las colectas de muestras en la región oriental de Guatemala. La distribución de geminivirus antes y después de la época lluviosa no varía mucho. En la región oriental, antes de la época lluviosa, el porcentaje de muestras positivas para geminivirus es de 20.4%, mientras que en la época posterior a las lluvias fue de 18.58%. En el sur se observa que los porcentajes de muestras positivas para geminivirus son menores que en el oriente y además también se nota que estos porcentajes no varían considerablemente en ambas épocas. Esto indica que aunque las poblaciones de *Bemisia tabaci* disminuyen durante la época lluviosa, las mismas vuelven a alcanzar sus niveles iniciales. También podría ser un indicador de que la infección de geminivirus por parte de la mosca blanca se mantiene casi constante.

Gráfica 9: Distribución de geminivirus según la época de colecta (Antes y después de la época lluviosa)

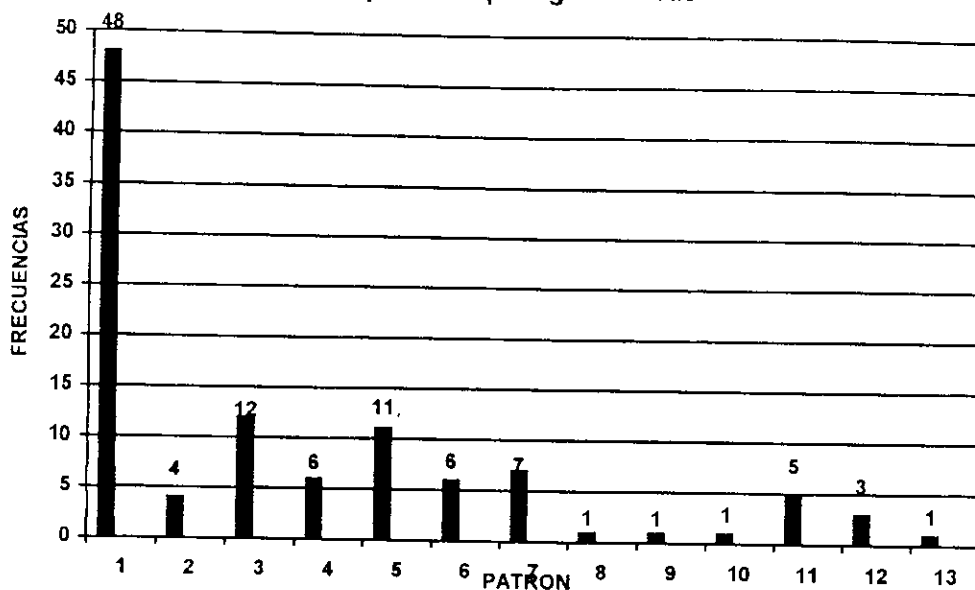


### C. DETECCIÓN DE TIPOS DE GEMINIVIRUS POR SSCP (Single strand conformation polymorphism):

Con el análisis de PCR únicamente se determinó la presencia/ausencia de geminivirus en las muestras analizadas, el análisis de PCR-SSCP permitió distinguir diferencias a nivel molecular entre los diferentes geminivirus detectados. Debido a esto, a las muestras que resultaron positivas para geminivirus mediante el análisis de PCR, se les efectuó un análisis de SSCP. A partir de este análisis se obtuvieron 13 patrones de SSCP característicos bajo los cuales se pudieron clasificar las muestras positivas.

Los diferentes patrones obtenidos a partir del análisis de SSCP se ilustran en el apéndice C. En la gráfica 10 se ilustra la distribución de patrones de SSCP de las muestras positivas para geminivirus. Se observó que el patrón 1 es el más frecuente (45.28%), seguido por el patrón 3 (11.32%), el patrón 5 (10.38%), el patrón 7 (6.6%), los patrones 4 y 6 con 5.66%, patrón 11 (4.72%), patrón 2 (3.77%), el patrón 12 (2.83%) y por último los patrones 8, 9, 10 y 13 los cuales representan un 0.94% del total.

Gráfica 10: Distribución de patrones de SSCP de las muestras positivas para geminivirus



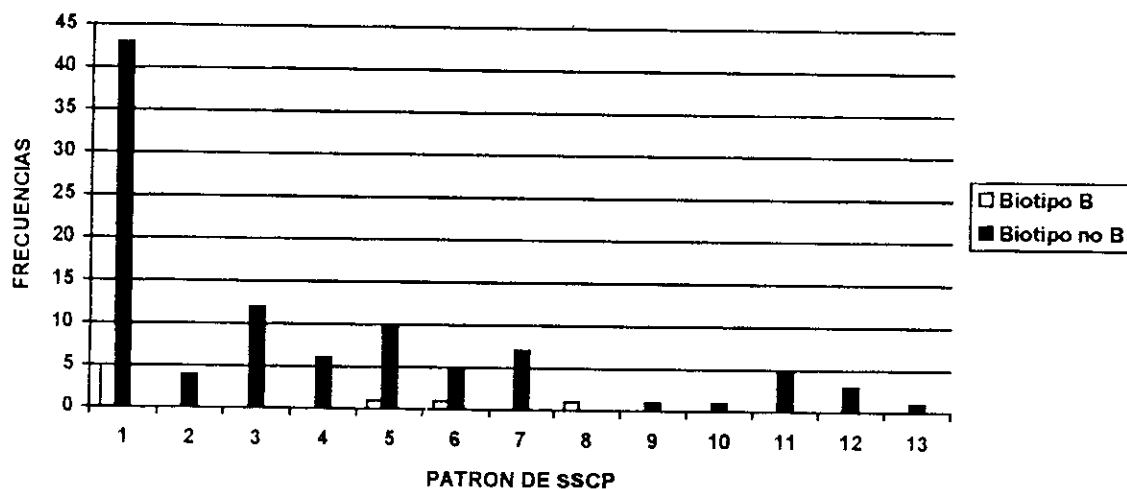
El cuadro 1 muestra la distribución de patrones de SSCP según el cultivo. El patrón 1, además de ser el más común, fue encontrado en muestras de los cinco cultivos estudiados, lo que podría indicar que es el virus mejor adaptado, ya que puede existir en un rango amplio de cultivos. El patrón 3, el segundo más frecuente, fue encontrado en chile, tomate, frijol y tabaco, pero no se encontró en ninguna cucúrbita. El patrón 5, a pesar de ser menos frecuente que el 3, se encontró en los cinco cultivos estudiados. El patrón 4 fue encontrado únicamente en frijol y cucúrbitas, el patrón 6 en chile y tabaco y el 7 únicamente se encontró en cultivos de chile y cucúrbitas. Se observó que los patrones de las muestras analizadas que fueron colectadas en los cultivos de chile son los que mayor variabilidad presentan, ya que se encontraron 8 patrones diferentes, de los cuales 2 son exclusivos de este cultivo. Esto podría indicar que éste cultivo provee de mejores condiciones para que el virus se adapte y sobreviva. El frijol fue el cultivo que presentó la menor cantidad de patrones. Todos los cultivos poseían al menos un patrón característico, a excepción del frijol. El análisis de varianza indica que la diferencia en la distribución de patrones según el cultivo es significativa

Cuadro I: Distribución de patrones de SSCP según cultivo

CULTIVO	PATRONES ENCONTRADOS
Chile	1,3,5,6,7,9,10 y 11
Tomate	1,2,3,5,11 y 12
Tabaco	1,3,5,6,12 y 13
Frijol	1,3,4 y 5
Cucúrbitas	1,4,5,7,8 y 12

En la gráfica 11 se muestra la distribución de patrones de SSCP de geminivirus según el biotipo de *B. tabaci* que lo transmite. Se observó que los patrones 1, 5 y 6 son transmitidos por *B. tabaci* tanto del biotipo B como del no B. Estos patrones se encontraron en dos cultivos exclusivos: chile y tabaco. El patrón 8 es transmitido sólo por el biotipo B y se encontró únicamente en cucúrbitas. Se notó que el patrón 3 es transmitido por *B. tabaci* biotipo no B y se encuentra en un rango amplio de cultivos como lo son el chile, el tabaco, el tomate y el frijol.

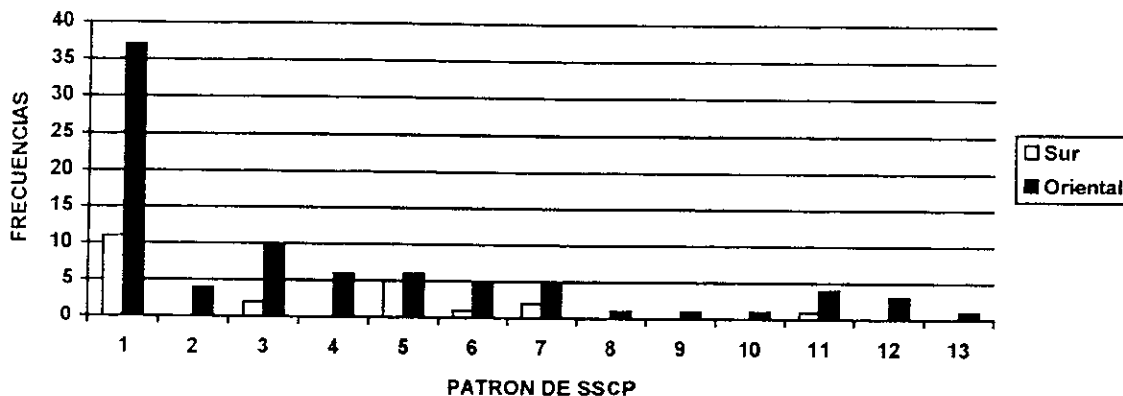
El resto de patrones, correspondientes a distintos geminivirus, son transmitidos por los otros biotipos de *Bemisia tabaci*. Esto confirma que los distintos biotipos de *B. tabaci* transmiten distintos tipos de geminivirus y que algunos tipos de geminivirus son comunes para los biotipos B y no B. También se observó que el biotipo B transmite menos tipos de geminivirus y en menor proporción que el biotipo no B.

Gráfica 11: Distribución de patrones de SSCP según biotipo de *Bemisia tabaci*

En la siguiente gráfica se aprecia la distribución de patrones de SSCP según la región de estudio. Se notó que ambas regiones tienen 6 patrones de SSCP en común, lo que significa 6 tipos de geminivirus en común. A simple vista, se notó que la región oriental tiene la mayor variedad de geminivirus, ya que aquí se encontraron todos los patrones de SSCP y en mayores proporciones que en el sur; además de encontrarse patrones exclusivos que no se encuentran en la otra región. Pero debe tomarse en consideración que en algunos patrones existe sólo una muestra, lo que no permite hacer una conclusión concreta.

El análisis de varianza reveló que las diferencias que pudieran existir en la distribución de los patrones no son significativas y ello podría deberse al número tan pequeño de muestras en cada patrón. Sería necesario tener un mayor número de muestras para poder sacar una conclusión confiable.

**Gráfica 12: Distribución de patrones de geminivirus según región de muestreo**



## VI. CONCLUSIONES

1. De las 732 muestras de *Bemisia tabaci* analizadas, fue posible detectar 108 positivas para geminivirus, lo cual representa 15% del total de muestras.
2. 7% de las muestras positivas para geminivirus fueron detectadas en individuos de *B. tabaci* pertenecientes al biotipo B. Las muestras positivas y negativas de geminivirus se distribuyen aproximadamente con la misma frecuencia entre los distintos biotipos de *Bemisia tabaci*. La frecuencia con la que aparece el virus no es la misma para todos los biotipos, lo que indica que los geminivirus tienen preferencias por el biotipo no B.
3. Se detectó la presencia de geminivirus en los cinco cultivos estudiados, encontrándose un mayor porcentaje de muestras positivas en cultivos de tomate y chile. La distribución de muestras positivas y negativas para geminivirus es similar en los cultivos estudiados. Existen preferencias por parte de los geminivirus hacia ciertos cultivos; en este caso hay una predilección por los cultivos de chile y tomate.
4. Se detectaron muestras positivas para geminivirus en ambas regiones de estudio, encontrándose una mayor proporción de muestras positivas en la región oriental. No hay preferencias por el biotipo de *Bemisia tabaci* que transmite el virus en ninguna de las dos regiones. La distribución de frecuencias de muestras positivas para geminivirus en los biotipos de *B. tabaci* es casi la misma tanto en el sur como en el oriente.
5. Se encontró un mayor porcentaje de muestras positivas para geminivirus en un rango de altitudes que va de los 801 a los 1000 metros sobre el nivel del mar. La distribución de geminivirus no es equitativa entre los rangos de altitudes; esta preferencia es significativa. Al considerar sólo los casos positivos para geminivirus se determinó que si hay preferencia por ciertos rangos de altitudes, específicamente el rango de los 801-1000 metros sobre el nivel del mar. En el rango de los 201-400 metros sobre el nivel del mar fué donde se encontró el menor

porcentaje de muestras positivas para geminivirus. El análisis estadístico reveló que esta preferencia también es significativa.

6. No existe una diferencia significativa entre la distribución de geminivirus antes de la época lluviosa y después de la época de lluvias.
7. La distribución de geminivirus en los diferentes rangos de altitudes así como en ambas regiones de estudio puede ser un reflejo de las distintas prácticas de cultivo que se tienen en las distintas regiones del país. Estas prácticas pueden determinar la manera en que se distribuyen y propagan los geminivirus por medio del vector *Bemisia tabaci*.
8. Existe polimorfismo en la secuencia amplificada por PCR perteneciente al gen que codifica para la proteína de cobertura de geminivirus. Estos polimorfismos se detectaron en forma de patrones de bandas de SSCP (Single strand conformation polymorphism) los cuales se clasificaron tentativamente en 13 patrones de bandas aparentemente distintos, cada uno de ellos representa un tipo diferente de virus.
9. De los 13 patrones de bandas de SSCP, el patrón 1 es el más frecuente.
10. Se encontraron 3 tipos de geminivirus transmitidos tanto por *B. tabaci* biotipo B como del no B (patrones 1,5 y 6), pero se encontró un tipo de virus transmitido únicamente por el biotipo B y que es exclusivo de las cucúrbitas (patrón 8). Los patrones 1 y 5 fueron encontrados en todos los cultivos estudiados. En los cultivos de Chile fue en donde se detectaron el que mayor número de patrones de SSCP, además se encontraron 2 patrones exclusivos de este cultivo (7 y 10).
11. Las regiones sur y oriental poseen 6 tipos de geminivirus en común (patrones 1,3,5,6,7 y 11); en la región oriental se encontraron 7 tipos de virus que no se encontraron en el sur (2,4,8,9,10,12 y 13).

12. El biotipo no B es más virulífero que el biotipo B, ya que de los 13 patrones detectados, transmite 12 de ellos (no transmite el número 8). El biotipo B únicamente transmite 4 tipos de virus (1,5,6, y 8). El virus correspondiente al patrón 8 es transmitido únicamente por el biotipo B y se encuentra solamente en cultivos de cucúrbitas.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Efectuar muestreos en los que se hagan colectas en un mismo número de localidades en cada región y en cada rango de altitudes. Debido a que no se tienen muestras de cultivos situados en un rango de altitudes de los 601 a los 800 metros sobre el nivel del mar, se recomienda efectuar colectas en dichas áreas. De esta forma, se obtendrá un rango de estudio más amplio, en el que se podrán hacer mejores comparaciones para obtener conclusiones más confiables en cuanto a la distribución de los geminivirus, según la altitud en donde se encuentran los cultivos de interés.
2. Secuenciar algunas muestras representativas de cada patrón de SSCP resultante para comparar a nivel molecular los polimorfismos que pudieran existir y si tienen alguna significancia.
3. Efectuar un análisis filogenético para determinar las relaciones existentes entre los geminivirus detectados en las regiones estudiadas con geminivirus que hayan sido estudiados en otras regiones. Esto podría ayudar a determinar algunos factores que pudieron haber influido en el apareamiento de nuevos geminivirus.
4. Diseñar programas de control biológico de *Bemisia tabaci* al emplear la información obtenida en este estudio.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Awise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. 1era ed. Chapman & Hill Estados Unidos. 511 pp.
- Beard, C.B.; D. Mills y F.H. Collins. 1993. "The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects" Insect Molecular Biology. 2 (2), pp 103-124
- Beatty, B.J y W.C. Marquardt. 1996. The biology of disease vectors. 1era. Ed. University Press of Colorado. Estados Unidos. 632 pp.
- Blum, H.; H.Beier y H.J. Gross. 1987. "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels". Electrophoresis. Vol. 8, pp 93-99.
- Brown, J.C. 1995. What the heck is PCR? Internet
- Brown, J.K. 1991. "An update on the whitefly-transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean Basin" FAO Plant Prot. Bull. 39:5-23
- Brown, J.K y J. Bird. 1992. "Whitefly-transmitted geminivirus and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin". Plant Disease. Vol. 76 No. 3.
- Caballero, R. 1992. "Importancia de la identificación de biotipos de *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Centroamérica". Memoria II Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus

- Calderón, L.F. 1995. "El Problema mosca blanca-virosis y métodos de control en tomate".  
Biología y manejo del complejo mosca blanca-virosis. Comisión guatemalteca contra Mosca blanca.
- Fields, B.N; D.M. Knipe; P.M. Hanley. 1996. Fundamental Virology. 3era ed.  
Lippincott-Raven Publishers. Estados Unidos. 1340 pp.
- Frohlich, D.R.; B.A. Stevenson; A.M. Peterson y M.A. Wells. 1996. "Mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I of *Manduca sexta* and a comparison with other invertebrate genes".  
Compendium of Biochemical Physiology. Vol. 113 B. No. 4, 785-788
- Green, S.K. y G. Kalloo. 1994. Leaf curl and yellowing viruses of pepper and tomato: An overview. Asian Vegetable Research and Development Center. Technical Bulletin No. 21, 51 pp.
- Hayashi, K. 1991. "PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA". PCR Methods and Applications. 1:34-38 C., 34-38.
- Hoy, M.A. 1994. Insect Molecular Genetics: An introduction to principles and applications. Iera. Ed. Academic Press. U.S.A. 546 pp.
- Kambhampati, S. y P.T. Smith. 1995. "PCR imprimadores for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments". Insect Molecular Biology. 4(4), 233-236.
- Mehta, P.; J.A. Wyman; M.K. Nakhla y D.P. Maxwell. 1994. "Polymerase Chain Reaction detection of viruliferous *Bemisia Tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato-infecting geminiviruses" Journal of Economic Entomology. Vol. 87, No. 5.
- Mitchell, S.E.; A.F. Cockburn; J.A. Seawright. 1993. "The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: complete nucleotide sequence and gene organization"  
Genome. Vol 36., 1058-1072.

- Morales, F.J. 1995. "Los Geminivirus transmitidos por mosca blanca" Memoria II Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus.
- Perring, T.M.; A. Cooper; D.J. Kazmer; C. Shields; J. Shields. 1991. "New strain of sweetpotato whitefly invades California vegetables". California Agriculture. Vo. 45, No. 6., 10-12
- Rabilloud, T; L. Vuillard; C. Gilly y J.J. Lawrence. 1994. "Silver-staining of proteins in polyacrilamide gels: a general overview". Cellular and Molecular Biology. 40 (1), 57-75
- Salguero, V. 1994. Manejo de mosca blanca y acolochamiento del tomate. Ministerio de agricultura, ganadería y alimentación. Delgado Impresos y Cía Ltda. 26 pp.
- Sambrooks, J.S.; E.F. Fritsch; T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos. Tomos 1,2,3.
- Simon, C.; F.Frati; A. Beckenbach, B. Crespi; H. Liu y P. Flook. 1994. "Evolution, Weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction imprimadores" Entomological Society of America. Vol. 87 No. 6
- Traboulsi, R. 1994. "*B.tabaci*: a report on its pest status with particular reference to the Near East". FAO Plant Prot. Bulletin. Vol 42/1-2., 33-58

## APENDICE A

### 1. Preparación de solución amortiguadora de lisis para mosca blanca

CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN FINAL (1 ml)
Tris-HCl 5 mM pH 8.0	5 mM	5 ul
EDTA 0.5 mM pH 8.0	0.5 mM	1 ul
Nonident P-40 0.5%	0.5%	5 ul
Proteinasas K 1.0 mg/ml	1.0 mg/ml	0.001 g
Agua destilada y estéril	-	989.0 ml

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

Reactivo (Concentración del Stock)	Volumen a agregar del stock
Solución amortiguadora 10x	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.5 $\mu$ l
dNTP's 2.5 mM	1.5 $\mu$ l
imprimador 514	0.75 $\mu$ l
imprimador 1048	0.75 $\mu$ l
Taq ADN polimerasa	0.25 $\mu$ l
molde de ADN (muestra)	6.0 $\mu$ l
agua destilada desionizada	9.75 $\mu$ l

### 3. Programa de amplificación para detección de geminivirus por PCR

a) 1 ciclo:

2 minutos 95°C

b) 35 ciclos:

1 minuto a 95°C

1 minuto a 58°C

1 minuto a 72°C

c) 1 ciclo:

5 minutos a 72°C

#### 4. Preparación del gel de agarosa:

Mezclar 0.24 g de agarosa en 30 ml de solución amortiguadora TAE 1x. Calentar hasta que la agarosa se disuelva. Dejar enfriar la mezcla y verter en el recipiente de la cámara electroforética. Dejar reposar por 30 minutos hasta que el gel se haya gelificado.

#### 5. Preparación de gel de acrilamida:

- a) Para 50 ml. de solución de acrilamida: Mezclar 10.5 ml de solución stock de acrilamida, 6 ml de TBE 5X y 33.5 ml de agua destilada. Filtrar la solución al vacío para degasificar.

Solución amortiguadora TBE 50X:

540 g Tris base  
275 g ácido bórico  
200 ml EDTA 0.5M pH8  
8985 ml agua destilada estéril

- b) Agregar 50 ul de TEMED, mezclar, luego agregar 50 ul de persulfato de amonio 25% (p/v).  
c) Verter la solución a las placas de electroforesis, luego colocar los peines y esperar de 1 a 1 y 1/2 horas para que polimerice.  
d) Remover los peines y lavar los pozos con TBE 0.5X.

#### 6. Preparación solución TBE 5X:

Para 10 litros de solución mezclar:

540 g de Tris base  
275 g de ácido bórico  
200 ml de EDTA 0.5M pH 8  
8985 ml de agua destilada

#### 7. Solución TAE 50X:

Para 1 litro de solución mezclar:

242 g de Tris base  
57.1 ml de ácido acético  
100 ml de EDTA 0.5M pH 8

8. Solución EDTA 0.5M pH 8:

Para 2 litros de solución mezclar:

372.2 g de EDTA

40 g de NaOH

2000 ml de agua destilada

9. Preparación de ácido acético al 10%

Para 100 ml de solución:

Mezclar 10 ml de ácido acético concentrado en 90 ml de agua destilada.

APENDICE B

A. Materiales y Equipo

I. Reactivos:

Reactivo	Marca	Especificaciones
Tris-HCl	Sigma	Grado reactivo
Nonident P-40	Sigma	Grado reactivo
EDTA	Sigma	Grado reactivo
Proteinasa K	Sigma	Grado Biología Molecular
deoxinucleótidos trifosfatados	Promega	Grado Biología Molecular
Cloruro de Magnesio	Promega	Grado Biología Molecular
Solución amortiguadora 10x para PCR	Promega	Grado Biología Molecular
Taq ADN polimerasa	Promega	Grado Biología Molecular
Acido bórico	J.T. Baker	Grado reactivo
Agarosa	Sigma	Grado Biología Molecular, uso rutinario
Acrilamida	Merck	Grado Biología Molecular
Bis-acrilamida	Merck	Reactivo pureza electroforesis
Nitrato de plata	Merck	Grado reactivo
Acido acético	Merck	Grado reactivo
Carbonato de sodio	Merck	Grado reactivo
TEMED	Bio-Rad	Grado reactivo
Persulfato de amonio	Sigma	Grado reactivo
Tiosulfato de sodio	J.T. Baker	Grado reactivo
Glicerol	Merck	Grado reactivo
Aceite mineral	Sigma	Grado Biología Molecular
Bromuro de etidio	Fisher Biotech	Reactivo pureza electroforesis
Formaldehido al 37%	Merck	Grado reactivo
Imprimador 514 para proteína de cobertura de geminivirus	GIBCO BRL	Secuencia: 5' GCCC (AT) TGTA (TC) AG (AG) AAGCC (AC) AG 3'
Imprimador 1048 para proteína de cobertura de geminivirus	GIBCO BRL	Secuencia: 5' GG (AG) TT (ATG) GA (GA) GCATG (TCA) GTAACATG 3'

2. Equipo:

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Especificaciones</b>
Termociclador	MI Research, Inc.	Modelo PTC-100
Fuente de poder	Sigma-Aldrich Techware	PS 251-1
Cámara de electroforesis horizontal	Sigma Chemical Co.	Mod. E 0638; 250 V DC; límites de operación: 250V DC, 15W, 60 mA, 50°C
Cámara de electroforesis vertical	Bio-Rad Mini Protean II	
Secador de geles	Bio-Rad	
Bloque térmico	Thermolyne	
Estufa con agitador magnético	Thermolyne	Nuova II
Micropipetas	Pipetman Gilsam	2, 10, 20 $\mu$ l
Micropipetas	Oxford	100 y 1000 $\mu$ l
Balanza analítica	Mettler	Modelo AE163
Esteroscopio	Heerbrugg	Modelo M3Z
Cámara de fotos UV	Fotodyne Polaroid	Modelo MP-ST

3. Materiales:

- Probetas 10, 50 y 100 ml.
- Beakers 50, 100, 250 y 500 ml.
- Agitadores magnéticos
- Papel encerado
- Morteros eppendorff
- Tubos eppendorff de 0.5 y 1.5 ml
- Cajas Petri
- Bulbos para pipetas
- Filtros Nalgene
- Cronómetros
- Gradillas para tubos eppendorff
- Puntas para micropipeta de 0.5-20, 40-200 y 50-1000  $\mu$ l
- Parafilm
- Erlenmeyers 125 ml
- Asas de montaje
- Espátulas
- Recipientes para tinción
- Frascos Wheaton de 125, 250, 500 y 1000 ml
- Pipetas Pasteur
- Papel encerado

APENDICE C

patrones de sscp de las muestras positivas de geminivirus



APENDICE D  
Cuadros de datos y resultados

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
1	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	1	5
2	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	6	5
3	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
4	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
5	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	1	5
6	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	13	5
7	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	3	5
8	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
9	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
10	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	12	5
12	EF39	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
13	EF39	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
14	EF39	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
15	EF39	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
16	EF39	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
17	EF39	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
18	EF39	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
19	EF39	Frijol	Oriente	no B	Positivo	1	5
20	EF39	Frijol	Oriente	no B	Positivo	3	5
41	EM02	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
42	EM02	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
55	EM105	Cucúrbita	Oriente	B	Positivo	12	2
56	EM105	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
57	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
58	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
59	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
60	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
61	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
62	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
63	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
64	EM105	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
65	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	2	5
66	ETo52	Tomate	Oriente	B	Positivo	6	5
67	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
68	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	12	5
69	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
70	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
71	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
72	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
73	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
74	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
103	SCu95	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
104	SCu95	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
105	SCu95	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
106	SCu95	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
107	SCu95	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
108	SCu95	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
109	SCu95	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
110	SCu95	Cucúrbita	Sur	no B	Positivo	5	2
111	SCu95	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
112	SCu95	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2

Rangos de altitud  
1 = 0-200 metros  
2 = 201-400 metros  
3 = 401-600 metros  
4 = 601-800 metros  
5 = 801-1000 metros  
6 = 1001-1200 metros

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Aititud
113	SCu95	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
114	SCu95	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
121	SS81	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
122	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
123	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	6	1
124	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	1	1
125	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
126	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
127	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	1	1
128	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
129	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
130	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	3	1
131	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
132	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
133	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
134	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
135	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
136	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	5	1
137	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
138	SS80	Cucúrbita	Sur	B	Positivo	1	1
139	SS80	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
140	SS80	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
141	SS80	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
142	SS80	Cucúrbita	Sur	no B	Positivo	5	1
143	SS80	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
144	SS80	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
145	SS80	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
146	SS80	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
147	SS80	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
148	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
149	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
150	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
151	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
152	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
153	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
154	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
159	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
160	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
161	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
162	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
163	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
164	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
165	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
166	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
167	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Positivo	5	2
168	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
169	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
170	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
171	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
172	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
173	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
174	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
175	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
176	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1

Rangos de altitud

- 1 = 0-200 metros
- 2 = 201-400 metros
- 3 = 401-600 metros
- 4 = 601-800 metros
- 5 = 801-1000 metros
- 6 = 1001-1200 metros

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
177	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
178	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
179	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
180	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
181	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
182	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
183	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
184	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
185	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
186	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
187	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
189	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
190	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
191	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
192	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
193	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
194	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
195	STo96	Tomate	Sur	no B	Positivo	1	1
196	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
197	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
198	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
209	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
210	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
211	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
212	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	5
213	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	5
214	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	5
215	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
216	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
217	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	5
218	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
219	EC41	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
220	EC41	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
221	EC41	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
222	EC41	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
223	EC41	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
229	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
230	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
231	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
232	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
233	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Positivo	1	2
234	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Positivo	1	2
235	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
236	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
237	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
238	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
239	EF49	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
240	EF49	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
241	EF49	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
242	EF49	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
243	EF49	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
244	ES54	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
245	ES54	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
246	ES54	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
247	ES54	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
248	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
249	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
250	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
251	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
252	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
253	STa85	Tabaco	Sur	no B	Negativo	0	1
254	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
255	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
256	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
257	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
258	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
259	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
260	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
261	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
262	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
263	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
264	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Positivo	7	2
265	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
266	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
267	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
268	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
269	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
270	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
271	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
272	SCu82	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
283	STo96	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
284	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
285	STo96	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
286	STo96	Tomate	Sur	B	Positivo	1	1
287	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
288	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
289	STo96	Tomate	Sur	no B	Positivo	1	1
290	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
291	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
292	STo96	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
293	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
294	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
295	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
296	SF78	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
297	SM92	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
298	SM92	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
299	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
300	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
301	SM92	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
302	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
303	SM92	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
304	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
305	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
306	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
307	SM92	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
308	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
309	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
310	EM105	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
311	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
312	EM105	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
313	EM105	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
314	EM105	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
315	EM105	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
316	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
317	EM105	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
318	SS80	Cucúrbita	Sur	no B	Positivo	1	1
319	SS80	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
320	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	3	1
321	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	1	1
322	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
323	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
324	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	11	1
325	SC79	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
326	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	5	1
327	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	1	1
328	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	1	1
329	SC79	Chile	Sur	no B	Positivo	7	1
330	STo87	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	2
331	EPe48	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
332	EPe48	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
333	EPe48	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
334	EPe48	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
335	EPe48	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
336	EPe48	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
337	EPe108	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
338	EPe108	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
339	EPe108	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
340	EPe108	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
341	EPe108	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
342	EPe108	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
343	EPe108	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
344	EPe108	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
345	EPe108	Cucúrbita	Oriente	B	Positivo	8	2
346	EPe108	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
347	EC53	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
348	EC53	Chile	Oriente	no B	Positivo	7	5
349	EC53	Chile	Oriente	no B	Positivo	7	5
350	EC53	Chile	Oriente	no B	Positivo	7	5
351	EC53	Chile	Oriente	no B	Positivo	7	5
352	EC50	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	6
353	EC50	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	6
354	EC50	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	6
355	EC50	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	6
356	EC50	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	6
357	EC50	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	6
358	EC50	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	6
359	EC50	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	6
360	EC50	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	6
361	EC50	Chile	Oriente	B	Negativo	0	6
362	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
363	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
364	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6

Muestra	Código	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
365	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
366	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
367	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
368	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
369	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
370	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
371	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
372	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
373	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
374	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
375	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
376	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
377	ES104	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
378	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	1	5
379	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	1	5
380	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
381	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	6	5
382	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
383	ETo26	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	2
384	ETo26	Tomate	Oriente	no B	Positivo	5	2
385	ETo26	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	2
386	ETo26	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	2
387	ETo26	Tomate	Oriente	B	Positivo	1	2
388	ETo47	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	6
389	ETo47	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	6
390	ETo47	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	6
391	ETo47	Tomate	Oriente	no B	Positivo	11	6
392	ETo47	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	6
393	ETo47	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	6
394	ETo47	Tomate	Oriente	no B	Positivo	11	6
395	ETo47	Tomate	Oriente	no B	Positivo	11	6
396	ETo47	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	6
397	ETo47	Tomate	Oriente	no B	Positivo	11	6
398	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	1	5
399	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	3	5
400	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
401	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
402	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	2	5
403	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	3	5
404	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	3	5
405	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	2	5
406	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	5
407	ETo52	Tomate	Oriente	no B	Positivo	2	5
408	EC41	Chile	Oriente	no B	Positivo	1	5
409	EC41	Chile	Oriente	no B	Positivo	1	5
410	EC41	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
411	EC41	Chile	Oriente	no B	Positivo	9	5
412	EC41	Chile	Oriente	no B	Positivo	3	5
413	EC41	Chile	Oriente	B	Negativo	0	5
414	EPe103	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
415	EPe103	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
416	EPe103	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
417	EPe103	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
418	EPe103	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
419	EPe103	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
420	EPe103	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
421	EPe103	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
422	EPe103	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
423	EPe103	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
424	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
425	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
426	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
427	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
428	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
429	EC41	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
430	EC41	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
431	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
432	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
433	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
434	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
435	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	3	5
436	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
437	ETa46	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	5
438	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
439	ETa46	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	5
440	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
441	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
442	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
443	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
444	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
445	ETa46	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
446	EF49	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
447	EF49	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
448	EF49	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
449	EC53	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
450	EC53	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
451	ES43	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
452	ES43	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
453	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
454	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
455	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
456	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
457	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
458	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
459	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
460	ES51	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
461	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
462	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
463	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
464	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
465	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
466	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
467	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
468	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
469	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
470	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
471	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
472	ETa42	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
473	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
474	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
475	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
476	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
477	SM92	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
478	EF39	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
479	EF39	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
480	EF39	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
481	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
482	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
483	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
484	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
485	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
486	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
487	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
488	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
489	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
490	EM106	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
491	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
492	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
493	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
494	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
495	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
496	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
497	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
498	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
499	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
500	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
501	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
502	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
503	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
504	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
505	EPe406	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
506	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
507	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
508	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
509	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
510	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
511	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
512	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
513	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
514	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
515	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
516	ETo408	Tomate	Oriente	B	Negativo	0	2
517	ETo408	Tomate	Oriente	B	Negativo	0	2
518	ETo408	Tomate	Oriente	B	Negativo	0	2
519	ETo408	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	2
520	ETo408	Tomate	Oriente	B	Negativo	0	2
521	ETo408	Tomate	Oriente	B	Negativo	0	2
522	ETo411	Tomate	Oriente	B	Negativo	0	2
523	ETo411	Tomate	Oriente	B	Negativo	0	2
524	ETo411	Tomate	Oriente	B	Negativo	0	2
525	ETo411	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	2
526	ETo411	Tomate	Oriente	B	Negativo	0	2

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
527	ETa409	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	2
528	ETa409	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	2
529	ETa409	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	2
530	ETa409	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	2
531	ETa409	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	2
532	ETa409	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	2
533	ETa409	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	2
534	ETa409	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	2
534	ETa409	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	2
536	ETa409	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	2
537	ETo351	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	2
538	ETo351	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	2
539	ETo351	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	2
540	ETo351	Tomate	Oriente	B	Negativo	0	2
541	ETo351	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	2
542	ETa344	Tabaco	Oriente	no B	Positivo	5	5
543	ETa344	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
544	ETa344	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
545	ETa344	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	5
546	ETa344	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
547	ETa344	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
548	ETa344	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	5
549	ETa344	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
550	ETa344	Tabaco	Oriente	B	Positivo	5	5
551	ETa344	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	5
552	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
553	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
554	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
555	EM410	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
556	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
557	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
558	EF521	Frijol	Oriente	no B	Positivo	1	5
559	EF521	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
560	EF521	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
561	EF521	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
562	EF521	Frijol	Oriente	no B	Positivo	1	5
563	EF521	Frijol	Oriente	no B	Positivo	1	5
564	EF521	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
565	EF521	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
566	EF521	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	5
567	EF521	Frijol	Oriente	no B	Positivo	1	5
568	ECu535	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
569	ECu535	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
570	ECu535	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
571	ECu535	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
572	ECu535	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	6
573	EF543	Frijol	Oriente	no B	Positivo	1	3
574	EF543	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	3
575	EF543	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	3
576	EF543	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	3
577	EF543	Frijol	Oriente	no B	Positivo	3	3
578	EPe522	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	4	5
579	EPe522	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
580	EPe522	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
581	EPe522	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
582	EPe522	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
583	EPe522	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
584	EPe522	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
585	EPe522	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
586	EPe522	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
587	EPe522	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	4	5
588	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	1	5
589	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	1	5
590	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	1	5
591	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	1	5
592	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	1	5
593	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
594	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
595	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	1	5
596	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	1	5
597	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
598	EC528	Chile	Oriente	no B	Positivo	3	5
599	EC528	Chile	Oriente	no B	Positivo	7	5
600	EC528	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
601	EC528	Chile	Oriente	no B	Positivo	5	5
602	EC528	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
603	EC528	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
604	EC528	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
605	EC528	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
606	EC528	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
607	EC528	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
608	EF533	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	3
609	EF533	Frijol	Oriente	B	Negativo	0	3
610	EF533	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	3
611	EF533	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	3
612	ETo532	Tomate	Oriente	no B	Positivo	0	3
613	ETo532	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	3
614	ETo532	Tomate	Oriente	no B	Positivo	0	3
615	ETo532	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	3
616	ETo532	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	3
617	ETo532	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	3
618	ETo532	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	3
619	ETo532	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	3
620	ETo532	Tomate	Oriente	no B	Negativo	0	3
621	EC531	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	3
622	EC531	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	3
623	EC531	Chile	Oriente	no B	Positivo	6	3
624	EC531	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	3
625	EC531	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	3
626	EC531	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	3
627	EF537	Frijol	Oriente	no B	Positivo	4	6
628	EF537	Frijol	Oriente	no B	Positivo	4	6
629	EF537	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	6
630	EF537	Frijol	Oriente	no B	Negativo	0	6
631	EF537	Frijol	Oriente	no B	Positivo	5	6
632	EF537	Frijol	Oriente	no B	Positivo	3	6
633	ECu529	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	6	3
634	EC528	Chile	Oriente	no B	Positivo	5	5

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
635	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
636	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	4	5
637	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	1	5
638	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
639	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
640	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
641	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
642	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
643	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Positivo	1	5
644	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
645	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
646	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
647	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
648	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
649	ECu526	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	5
650	EC531	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	3
651	EC531	Chile	Oriente	B	Negativo	0	3
652	EC531	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	3
653	EC531	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	3
654	EC531	Chile	Oriente	no B	Positivo	10	3
655	EC528	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
656	EC528	Chile	Oriente	no B	Positivo	4	5
657	EC528	Chile	Oriente	no B	Negativo	0	5
658	EC528	Chile	Oriente	B	Negativo	0	5
659	ETa409	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	2
660	ETa409	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	2
661	ETa409	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	2
662	ETa409	Tabaco	Oriente	B	Negativo	0	2
663	ETa409	Tabaco	Oriente	no B	Negativo	0	2
664	EM410	Cucúrbita	Oriente	no B	Negativo	0	2
665	EM410	Cucúrbita	Oriente	B	Negativo	0	2
666	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
667	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
668	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
669	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
670	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
671	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
672	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
673	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
674	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
675	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
676	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
677	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
678	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
679	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
680	Tilapa	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
681	Pue.nvo.	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
682	Pue.nvo.	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
683	Pue.nvo.	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
684	Pue.nvo.	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
685	Pue.nvo.	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
686	Pue.nvo.	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
687	Pue.nvo.	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
688	Pue.nvo.	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patron	Altitud
689	Pue nvo.	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
690	Pue nvo.	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
691	Coyuta	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
692	Coyuta	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
693	Coyuta	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
694	Coyuta	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
695	Coyuta	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
696	EM410	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
697	EM410	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
698	EM410	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
699	EM410	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
700	EM410	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
701	EM410	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
702	Naranjo	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
703	Naranjo	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
704	Naranjo	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
705	Naranjo	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
706	Naranjo	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
707	Naranjo	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
708	Naranjo	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
709	Naranjo	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
710	Naranjo	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
711	Naranjo	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
712	Tecoate	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
713	Tecoate	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
714	Tecoate	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
715	Tecoate	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
716	Tecoate	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
717	Tecoate	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
718	Tecoate	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
719	Tecoate	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
720	Tecoate	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
721	Tecoate	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
722	ICTA	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
723	ICTA	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
724	ICTA	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
725	ICTA	Frijol	Sur	B	Negativo	0	1
726	ICTA	Frijol	Sur	no B	Negativo	0	1
727	Naranjo	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
728	Naranjo	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
729	Naranjo	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
730	Naranjo	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
731	Naranjo	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
732	Tiquisate	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
733	Tiquisate	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
734	Tiquisate	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
735	Tiquisate	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
736	Tiquisate	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
737	Tiquisate	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	2
738	Tiquisate	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
739	Tiquisate	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
740	Tiquisate	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
741	Tiquisate	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	2
742	Coyuta	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1

Muestra	Código	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
743	Coyuta	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
744	Coyuta	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
745	Coyuta	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
746	Coyuta	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
747	Coyuta	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
748	Coyuta	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
749	Coyuta	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
750	Coyuta	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
751	Coyuta	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
752	El Custo	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
753	El Custo	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
754	El Custo	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
755	El Custo	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
756	Tecoiate	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
757	Tecoiate	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
758	Tecoiate	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
759	Tecoiate	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
760	Tecoiate	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
761	Tecoiate	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
762	Tecoiate	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
763	Tecoiate	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
764	Tecoiate	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
765	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
766	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
767	Concep	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
768	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
769	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
770	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
771	Concep	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
772	Concep	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
773	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
774	Concep	Tomate	Sur	B	Negativo	0	1
775	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
776	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
777	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
778	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
779	Concep	Tomate	Sur	no B	Negativo	0	1
780	Arisco	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
781	Arisco	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
782	Arisco	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
783	Tecoiate	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
784	Tecoiate	Chile	Sur	B	Negativo	0	1
785	Tecoiate	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
786	Tecoiate	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
787	Tecoiate	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
788	Nva Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
789	Nva Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
790	Nva Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
791	Nva Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
792	Nva Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
793	Nva Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
794	Nva Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
795	Nva Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
796	Nva Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1

Muestra	Codigo	Cultivo	Región	Biotipo	Presencia	Patrón	Altitud
797	Nva.Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
798	Nva.Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
799	Nva.Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
800	Nva.Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
801	Nva.Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
802	Nva.Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
803	Nva.Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
804	Nva.Conc	Chile	Sur	no B	Negativo	0	1
805	Maquina	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
806	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
807	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
808	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
809	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
810	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
811	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
812	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
813	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
814	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
815	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
816	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
817	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
818	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
819	Maquina	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1
820	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
821	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
822	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
823	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Positivo	1	1
824	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
825	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
826	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
827	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
828	Maquina	Cucúrbita	Sur	B	Negativo	0	1
829	Maquina	Cucúrbita	Sur	no B	Negativo	0	1

\*\*\*\*\* Analysis of Variance -- design 1\*\*\*\*\*

EFFECT .. BIOTIPO

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 0, N = 346 )

Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.00506	1.76450	2.00	694.00	.172
Hotellings	.00509	1.76450	2.00	694.00	.172
Wilks	.99494	1.76450	2.00	694.00	.172
Roys	.00506				

Note.. F statistics are exact.

-----  
EFFECT .. BIOTIPO (Cont.)

Univariate F-tests with (1,695) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
PRESENCI	.12070	70.01659	.12070	.10074	1.19811	.274
PATRON	9.33071	1849.82431	9.33071	2.66162	3.50565	.062

-----

\* \* \* \* \* A n a l y s i s o f V a r i a n c e -- design 1 \* \* \* \* \*

EFFECT .. ALTITUD

Multivariate Tests of Significance (S = 2, M = 1/2, N = 346 )

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.02593	2.28247	8.00	1390.00	.020
Hotellings	.02643	2.28944	8.00	1386.00	.020
Wilks	.97416	2.28596	8.00	1388.00	.020
Roys	.02164				

Note.. F statistic for WILKS' Lambda is exact.

-----  
 EFFECT .. ALTITUD (Cont.)

Univariate F-tests with (4,695) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
PRESENCI	1.16005	70.01659	.29001	.10074	2.87873	.022
PATRON	38.61312	1849.82431	9.65328	2.66162	3.62685	.006

-----

\*\*\*\*\* Analysis of Variance -- design 1\*\*\*\*\*

EFFECT .. REGION

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 0, N = 346 )

Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.00162	.56270	2.00	694.00	.570
Hotellings	.00162	.56270	2.00	694.00	.570
Wilks	.99838	.56270	2.00	694.00	.570
Roys	.00162				

Note.. F statistics are exact.

-----  
EFFECT .. REGION (Cont.)

Univariate F-tests with (1,695) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
PRESENCI	.00056	70.01659	.00056	.10074	.00551	.941
PATRON	1.92610	1849.82431	1.92610	2.66162	.72366	.395

-----

\*\*\*\*\* Analysis of Variance -- design 1\*\*\*\*\*

EFFECT .. CULTIVO

Multivariate Tests of Significance (S = 2, M = 1/2, N = 346 )

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.01434	1.25483	8.00	1390.00	.263
Hotellings	.01449	1.25529	8.00	1386.00	.263
Wilks	.98569	1.25506	8.00	1388.00	.263
Roys	.01196				

Note.. F statistic for WILKS' Lambda is exact.

-----  
EFFECT .. CULTIVO (Cont.)

Univariate F-tests with (4,695) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
PRESENCI	.45529	70.01659	.11382	.10074	1.12982	.341
PATRON	22.39771	1849.82431	5.59943	2.66162	2.10377	.079

-----  
Adjusted and Estimated Means

Variable .. PRESENCI

CELL	Obs. Mean	Adj. Mean	Est. Mean	Raw Resid.	Std. Resid.
1	.091	.091	.091	.000	.000
2	1.000	1.000	1.000	.000	.000
3	.400	.400	.400	.000	.000
4	.222	.222	.222	.000	.000
5	.448	.448	.448	.000	.000
6	.900	.900	.900	.000	.000
7	.059	.059	.059	.000	.000
8	.065	.065	.065	.000	.000
9	.000	.000	.000	.000	.000
10	.000	.000	.000	.000	.000
11	.250	.250	.250	.000	.000
12	.200	.200	.200	.000	.000
13	.667	.667	.667	.000	.000
14	.000	.000	.000	.000	.000
15	.000	.000	.000	.000	.000
16	.000	.000	.000	.000	.000
17	.200	.200	.200	.000	.000
18	.000	.000	.000	.000	.000

\* \* \* \* \* Analysis of Variance -- design 1 \* \* \* \* \*

EFFECT .. CULTIVO BY REGION

Multivariate Tests of Significance (S = 2, M = 1/2, N = 346 )

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.02573	2.26467	8.00	1390.00	.021
Hotellings	.02622	2.27152	8.00	1386.00	.021
Wilks	.97436	2.26810	8.00	1388.00	.021
Roys	.02148				

Note.. F statistic for WILKS' Lambda is exact.

-----  
 EFFECT .. CULTIVO BY REGION (Cont.)

Univariate F-tests with (4,695) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
PRESENCI	1.18593	70.01659	.29648	.10074	2.94295	.020
PATRON	37.78534	1849.82431	9.44633	2.66162	3.54910	.007

-----

\*\*\*\*\* Analysis of Variance -- design 1\*\*\*\*\*

EFFECT .. CULTIVO BY ALTITUD

Multivariate Tests of Significance (S = 2, M = 3, N = 346)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.09570	3.88092	18.00	1390.00	.000
Hotellings	.10408	4.00703	18.00	1386.00	.000
Wilks	.90505	3.94405	18.00	1388.00	.000
Roys	.08705				

Note.. F statistic for WILKS' Lambda is exact.

-----  
 EFFECT .. CULTIVO BY ALTITUD (Cont.)

Univariate F-tests with (9,695) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
PRESENCI	5.24794	70.01659	.58310	.10074	5.78802	.000
PATRON	157.24298	1849.82431	17.47144	2.66162	6.56422	.000

-----

\*\*\*\*\* Analysis of Variance -- design 1\*\*\*\*\*

EFFECT .. CULTIVO BY BIOTIPO

Multivariate Tests of Significance (S = 2, M = 1/2, N = 346 )

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.01557	1.36307	8.00	1390.00	.208
Hotellings	.01578	1.36722	8.00	1386.00	.206
Wilks	.98445	1.36515	8.00	1388.00	.207
Roys	.01453				

Note.. F statistic for WILKS' Lambda is exact.

-----  
 EFFECT .. CULTIVO BY BIOTIPO (Cont.)

Univariate F-tests with (4,695) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
PRESENCI	.56681	70.01659	.14170	.10074	1.40656	.230
PATRON	27.07770	1849.82431	6.76943	2.66162	2.54335	.039

-----

\* \* \* \* \* A n a l y s i s o f V a r i a n c e -- design 1 \* \* \* \* \*

EFFECT .. REGION BY BIOTIPO

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 0, N = 346 )

Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.00370	1.28833	2.00	694.00	.276
Hotellings	.00371	1.28833	2.00	694.00	.276
Wilks	.99630	1.28833	2.00	694.00	.276
Roys	.00370				

Note.. F statistics are exact.

-----  
EFFECT .. REGION BY BIOTIPO (Cont.)

Univariate F-tests with (1,695) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
PRESENCI	.19496	70.01659	.19496	.10074	1.93518	.165
PATRON	6.12206	1849.82431	6.12206	2.66162	2.30013	.130

-----

\*\*\*\*\* Analysis of Variance -- design 1\*\*\*\*\*

EFFECT .. BIOTIPO BY ALTITUD

Multivariate Tests of Significance (S = 2, M = 1/2, N = 346 )

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.01325	1.15880	8.00	1390.00	.321
Hotellings	.01342	1.16249	8.00	1386.00	.319
Wilks	.98675	1.16065	8.00	1388.00	.320
Roys	.01293				

Note.. F statistic for WILKS' Lambda is exact.

-----  
 EFFECT .. BIOTIPO BY ALTITUD (Cont.)

Univariate F-tests with (4,695) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
PRESENCI	.63771	70.01659	.15943	.10074	1.58251	.177
PATRON	22.59687	1849.82431	5.64922	2.66162	2.12248	.076

-----

\* \* \* \* \* A n a l y s i s o f V a r i a n c e -- design 1 \* \* \* \* \*

Tests of Significance for PATRON using UNIQUE sums of squares

Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
WITHIN+RESIDUAL	866.34	88	9.84		
CULTIVO	115.21	4	28.80	2.93	.025
REGION	34.67	1	34.67	3.52	.064
BIOTIPO	82.05	1	82.05	8.33	.005
ALTITUD	124.48	4	31.12	3.16	.018
CULTIVO BY REGION	14.65	2	7.33	.74	.478
CULTIVO BY BIOTIPO	54.42	2	27.21	2.76	.069
CULTIVO BY ALTITUD	91.55	4	22.89	2.32	.063
REGION BY BIOTIPO	20.91	1	20.91	2.12	.149
REGION BY ALTITUD	.00	0	.	.	.
BIOTIPO BY ALTITUD	.00	0	.	.	.
CULTIVO BY REGION BY BIOTIPO	.00	0	.	.	.
CULTIVO BY REGION BY ALTITUD	.00	0	.	.	.
CULTIVO BY BIOTIPO BY ALTITUD	.00	0	.	.	.
REGION BY BIOTIPO BY ALTITUD	.00	0	.	.	.
CULTIVO BY REGION BY BIOTIPO BY ALTITUD	.00	0	.	.	.
(Model)	363.33	19	19.12	1.94	.020
(Total)	1229.67	107	11.49		

R-Squared = .295  
Adjusted R-Squared = .143

-----