

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción
Agropecuaria

**Identificación de biotipos A, B y Q de *Bemisia tabaci* y la especie *Trialeurodes vaporariorum*,
en zonas de producción hortícola de
Honduras**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

Marcelino Santiago Guachambala Cando

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Marcelino Santiago Guachambala Cando

Honduras
Diciembre, 2007

Identificación de biotipos A, B y Q de *Bemisia tabaci* y la especie *Trialeurodes vaporariorum*, en zonas de producción hortícola de Honduras

Presentado por:

Marcelino Santiago Guachambala Cando

Aprobado:

María Mercedes Roca, Ph. D.
Asesora principal

Miguel Vélez, Ph. D.
Director de la Carrera de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Alfredo Rueda, Ph. D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph. D.
Decano Académico

Estela Aguilar, M. Sc.
Asesora

Kenneth L. Hoadley, D. B. A.
Rector

Abelino Pitty, Ph. D.
Coordinador de Fitotecnia

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso.

A mis Padres, Nelson y Gloria, por sus sabios consejos.

A mi hermana Mirta y a mi cuñado Manuel, por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Supremo Creador, por darme el regalo de la vida.

A toda mi familia, por el apoyo que me dan día a día.

A la familia Zelaya Aguilera, por su ayuda y sabios consejos en la EAP.

A mis amigos: Amanda Bustamante, Nelson Bravo, Paulina Naranjo, Carlos Molina, Fabián Días, Andrés Sarmiento y todos aquellos con quienes he compartido buenos momentos en la EAP, por su gran amistad y cariño, Gracias.

A todos mis asesores, en especial, a Estela Aguilar y Débora Casco por las largas horas de trabajo y apoyo en la realización de este estudio.

A la doctora Judith Brown (Universidad de Arizona) y al doctor Rafael Caballero, por su ayuda, confianza y por la formación impartida en mi pasantía.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A toda mi familia, por apoyarme en mis estudios.

Al proyecto IPM CRSP Virus, por financiar los análisis de este estudio.

A Proyecto de Manejo Integrado de Plagas en Centro América PROMIPAC-Zamorano, por su apoyo en las jornadas de recolección de muestras.

A la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, por la ayuda económica y por mi formación académica.

RESUMEN

Guachambala Cando M. 2007. Identificación de biotipos A, B y Q de *Bemisia tabaci* y la especie *Trialeurodes vaporariorum*, en zonas de producción hortícola de Honduras. Proyecto especial de graduación para el programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 17 p.

Las infecciones virales han sido una de las mayores causas de las pérdidas de los cultivos hortícolas en Honduras. Por la gran diversidad de vectores y la gran cantidad de virus, es difícil tener prácticas eficaces para manejar este problema. Los vectores más comunes en la transmisión de virus son áfidos trips y moscas blancas, de estas últimas existen unas 1200 especies, de las cuales 40 han sido reportadas en Centro América (posiblemente 200). *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* son las dos especies que se encuentran más distribuidas y a las cuales se les ha atribuido muchas pérdidas en la agricultura. *Bemisia tabaci* es el único vector reportado para Begomovirus, mientras que *Trialeurodes vaporariorum* no transmite este tipo de virus. El objetivo de este estudio fue documentar la densidad poblacional de moscas blancas en 12 zonas de producción hortícola en Honduras y determinar que tipo de moscas blancas están presentes. También tuvo como objetivo determinar si los biotipos A, B y Q de *Bemisia tabaci* y la especie *Trialeurodes vaporariorum* son prevalentes en estos cultivos. Se recolectaron muestras de cinco fincas o sitios por zona, obteniendo un total de 60 muestras. Para la identificación de los biotipos A, B, Q y de *Trialeurodes vaporariorum* se amplificó ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando primers específicos. El estudio muestra que hay una densidad poblacional variable de moscas blancas por zona muestreada. *Trialeurodes vaporariorum* es la especie dominante con un 61.3%, seguido del biotipo A con 26.6%, no se encontraron los biotipos B y Q, pero por medio de secuencia de ADN, se determinó la presencia de *Aleurodicus dugesii* (no transmite virus de importancia) en un 10%. Estos resultados confirman que el complejo Geminivirus-mosca blanca no son los causantes de las infecciones virales en las zonas muestreadas.

Palabras clave: *Aleurodicus dugesii*, Begomovirus, densidad poblacional, Geminivirus, hospedero, incidencia, ninfa, PCR, primers, proteinasa K.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Hoja de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimientos a patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de cuadros.....	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de anexos.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
CONCLUSIONES.....	16
RECOMENDACIONES.....	17
LITERATURA CITADA.....	12
ANEXOS.....	15

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Tipos de virus transmitidos por las moscas blancas.....	2
2. Códigos para estimar la densidad poblacional de moscas blancas.....	4
3. Zonas hortícolas muestreadas.....	6
4. Primers utilizados.....	7
5. Perfil térmico de PCR para Biotipo A, B y <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	8
6. Perfil térmico de PCR para Biotipo Q.....	8
7. Densidad poblacional de moscas blancas por zonas.....	9
8. Resultados del análisis de las moscas blancas recolectadas.....	11

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama de flujo que muestra la estrategia utilizada.....	5
2. Porcentaje de moscas blancas detectadas por Zamorano y la Universidad de Arizona (<i>Aleurodicus dugesii</i>) caracterizado por secuencia de ADN.....	10
3. Estudio filogenético de muestras. Cortesía laboratorio Brown. Universidad de Arizona (2007).....	12
4. Gel obtenida en los análisis de los biotipos A y B.....	13
5. Gel de <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	14
6. Relación filogenética entre <i>Trialeurodes vaporariorum</i> y <i>Aleurodicus dugesii</i>	14
7. Patrón obtenido para el biotipo Q.....	15

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Cuadro de diferencias entre <i>Trialeurodes vaporariorum</i> y <i>Bemisia tabaci</i> ...	15
2. Reactivos usados para la extracción de ADN de las moscas blancas.....	15
3. Mapa de las 12 zonas hortícolas muestreadas.....	16
4. Resultados de PCR para mtCOI, cortesía de la Universidad de Arizona, Laboratorio Brown (2007).....	16
5. Fotografías de ninfas de moscas blancas.....	17

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades virales han sido la principal causa de las pérdidas en cultivos hortícolas en Honduras y en otros países de Centro América. Debido a la gran diversidad de virus, con más de 16 órdenes, variedad de vectores y formas diversas de transmisión, es difícil conocer y establecer prácticas de manejo eficientes para la producción hortícola (Brown 1994; Brown *et al.* 1995; Brown y Bird 1992).

Últimamente se ha encontrado que varios cultivos hortícolas en Honduras, especialmente chile y tomate, son afectados por virus conocidos y otros que no han podido ser identificados, ya que posiblemente no son los serotipos del virus y por esta razón no son detectados con kits comerciales (Roca *et al.* 2007).

En los años 80's se reportó por primera vez la presencia de *Bemisia tabaci* (Gennadius), nombrándola como una plaga esporádica o secundaria, pero al culminar esa década se le atribuyó gran importancia por ser un vector de virus (Caballero 1992). Pero no necesariamente todos los virus son transmitidos por *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) u otras moscas blancas, sino que también por otros vectores como trips o áfidos. Otros virus como el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) son diseminados por transmisión mecánica a través de herramientas contaminadas o por semilla infectada. Un claro ejemplo es el cultivo de chile en la zona de Comayagua que tiene un problema de infecciones virales, del cual se han recolectado muestras desde 1999 hasta el 2007, Las muestras han sido analizadas en laboratorios de diversos países para tratar de identificar los agentes causales, pero la etiología es aun incierta (Roca *et al.* 2007).

Se han reportado 1200 especies de mosca blanca, pero no todas son causantes de enfermedades; se han detectado alrededor de 40 especies en Centroamérica, aunque se cree que existen unas 200 especies (Caballero 1994; Caballero y Rueda 1993), entre las cuales se encuentran: *Trialeurodes vaporariorum*, *Tetraleurodes mori*, *Bemisia tabaci*, *Aleurocanthus woglumi*, *Aleurohtrixus howardi*, *Aleurodicus dugesii*, entre otras (Hilje 1996).

“Debido a la importancia económica de *B. tabaci* y a que ésta se parece a otras especies no dañinas, muchos agricultores toman acción para controlar, principalmente con químicos, estas especies inocuas. Como consecuencia, se eliminan los enemigos naturales, se contamina el ambiente, y estas especies de moscas blancas se vuelven resistentes a los insecticidas, resurgiendo como plagas primarias.” (Caballero 1994).

De las moscas blancas sólo *Bemisia tabaci* transmite virus de la familia Geminiviridae del género Begomovirus de manera persistente. Otros tipos de moscas blancas transmiten otros virus como Crinivirus e Ipomovirus de manera semipersistente y los Carlavirus, Nepovirus y algunos Ipomovirus de manera no persistente, pero estos no constituyen grupos importantes de virus que causan pérdidas en cultivos hortícolas (Cuadro 1). Los Begomovirus sí causan pérdidas significativas en muchos países de la región (Brown *et al.* 1995; Bedford *et al.* 1994; Bird 1957), pero posiblemente su incidencia ha sido sobreestimada (Roca *et al.* 2006). No todos los virus causantes de enfermedades de plantas son transmitidos por moscas blancas y es necesario entender que muchos áfidos, trips y otros insectos son también transmisores de virus, incluyendo al hombre quien transmite mecánicamente virus al realizar ciertas prácticas agrícolas. La incidencia y severidad de las infecciones virales son variables, así como la etiología de los virus y vectores involucrados, la dinámica de las infecciones virales obedece a la época del año o ciclo del cultivo en cuestión, a las prácticas culturales utilizadas, a los sistemas agrícolas de la zona (cultivos vecinos, monocultivos con riego) y a los factores ambientales que influyen la dinámica poblacional de los vectores (Roca *et al.* 2007).

Cuadro 1. Tipos de virus transmitidos por las moscas blancas.

Vector	Tipos de virus	Ejemplos de Virus transmitidos
<i>Bemisia tabaci</i>	Geminivirus ∞(Begomovirus)	<i>Bean golden mosaic virus - Dom. Rep</i> (BGMV-DR) <i>Bean golden mosaic virus – Guatemala</i> (BGMV-Gua) <i>Tomato yellow leaf curl virus – China</i> (TYLCV-Ch)
	Potyvirus (Ipomovirus)	<i>Sweet potato T virus, sweet potato B virus</i> (SPMMV)
	Carlavirus	Cactus Virus (CV) (no reportado en Chile o en tomate)
	Nepovirus	<i>Grapevine Leaf Roll associated virus</i> (GLRaV)
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	∞Crinivirus	<i>Beet yellows virus</i> (BYV) <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV) <i>Strawberry infectious yellows virus</i> (SPaV)

Fuentes: Virus Taxonomy 2007; Plant Viruses Online (2007). ∞Importantes en cultivos hortícolas.

A *Bemisia tabaci* se le ha atribuido muchas de las pérdidas por infecciones virales en la mayoría de cultivos hortícolas importantes para la economía de países en Latinoamérica (Gerling *et al.* 1990). En los últimos años y con el advenimiento de mejores técnicas de detección para identificar infecciones virales, se ha cuestionado el impacto atribuido exclusivamente al complejo Geminivirus-mosca blanca en las pérdidas de los cultivos hortícolas en Honduras (Roca *et al.* 2006).

Desde el año 2000 se ha analizado en el laboratorio de Diagnóstico Molecular de Zamorano más de 2300 muestras de cultivos hortícolas y malezas, confirmando que la incidencia de los Geminivirus (Begomovirus) en cultivos hortícolas ha sido altamente sobreestimada (Roca *et al* 2006; Dávila Olivas 2007).

La existencia de biotipos de mosca blanca se propuso por los años 50s después de observar que eran difíciles de distinguir por el numeroso rango de hospederos, clima y adaptabilidad. Generalmente estos biotipos están descritos por: hospederos, fitotoxicidad, resistencia a pesticidas, morfología o comportamiento (Brown 1995; Hilge 2004; Pest Alert 2005). Se usa el término biotipo para diferenciar entre dos o más individuos morfológicamente parecidos, pero se diferencian en su comportamiento biológico y en su genoma (Bush 1993).

Se han realizado varios estudios de identificación de biotipos de mosca blanca en Centroamérica, pero en Honduras no se han hecho trabajos específicos en identificación de biotipos de moscas blancas. En mayo 2007 Zamorano realizó un estudio preliminar en colaboración con el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Colombia, en el cual se encontró que todas las muestras analizadas pertenecían a *Trialeurodes vaporariorum* y ninguna a *Bemisia tabaci*.

En el presente estudio se documentó la densidad poblacional de moscas blancas en 12 zonas productoras de cultivos hortícolas y se estableció que especies de moscas blancas estaban presentes en estas zonas con alta incidencia de infecciones. Este estudio fue complementado por un estudio paralelo cuyo objetivo fue “continuar con el diagnóstico de las infecciones virales presentes en Honduras, con énfasis en TYLCV y fitoplasmas en los cultivos de chile y tomate, así como las causadas por TMV, CMV, Begomovirus y Potivirus” (Dávila Olivas 2007), las muestras de tejido foliar para el análisis de virus fueron recolectadas al mismo tiempo y en las mismas fincas.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Origen de las muestras. En 12 zonas hortícolas de Honduras se colectaron muestras al azar de adultos y ninfas del envés de las hojas de los cultivos existentes y de las malezas (Pitty y Molina 1998; Muñoz y Pitty 1994) presentes dentro y en los alrededores del cultivo. Las muestras fueron conservadas en alcohol al 80%.

Se visitaron parcelas de producción donde se realizaron breves encuestas con los productores (Apreciación Rural Rápida, ARR) para establecer el criterio de prácticas agrícolas utilizado por el productor para manejar mosca blanca y virosis.

Durante el muestreo se documentó la densidad poblacional de este vector. Se analizaron cinco ninfas y cinco adultos de mosca blanca de cada valle, teniendo un total de 60 individuos. Para estimar la densidad poblacional se usó una escala usada por Caballero (1994) (Cuadro 2). La escala de la densidad poblacional está directamente relacionada al nivel de infestación del cultivo que permite la toma de decisiones adecuadas. Sin embargo, además de tomar en cuenta la densidad poblacional (variable cuantitativa), es importante determinar el tipo de mosca blanca (variable cualitativa) ya que muchas especies de moscas blancas no son vectores de virus.

Cuadro 2. Códigos para estimar la densidad poblacional de moscas blancas.

Código	Número de ninfas
1	Menos de 10 ninfas por hoja
2	11 a 20 ninfas por hoja
3	21 a 50 ninfas por hoja
4	51 a 100 ninfas por hoja

Fuente: Caballero 1994.

Para estimar la densidad poblacional no se tomaron en cuenta individuos adultos de mosca blanca ya que fue difícil realizar el conteo porque no siempre se llegaba en una hora propicia. Por lo que únicamente se tomó en cuenta el estado inmaduro de ninfa ya que éstas permanecen inmóviles.

Las áreas en donde se hicieron las recolecciones se indican en el cuadro 3. Las muestras fueron guardadas en frascos con alcohol al 80%. Se seleccionaron muestras al azar del mismo hospedero y zona, que se enviaron a analizar en la Universidad de Arizona y en Zamorano.

La técnica utilizada (Figura 1) para distinguir los biotipos de moscas blancas fue PCR (Polimerase Chain Reaction por sus siglas en inglés) descrita por Mullis (1982) usando primers específicos (Horowitz *et al.* 2005) para identificar los biotipos A, B, Q de *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (Cuadro 5, 6). Se usaron como controles positivos productos de PCR de los respectivos biotipos y de *Trialeurodes vaporariorum* que fueron obtenidos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Colombia. Además se tomó como referencia la medidas estimadas por estudios anteriores en una escalera molecular en una gel de electroforesis.

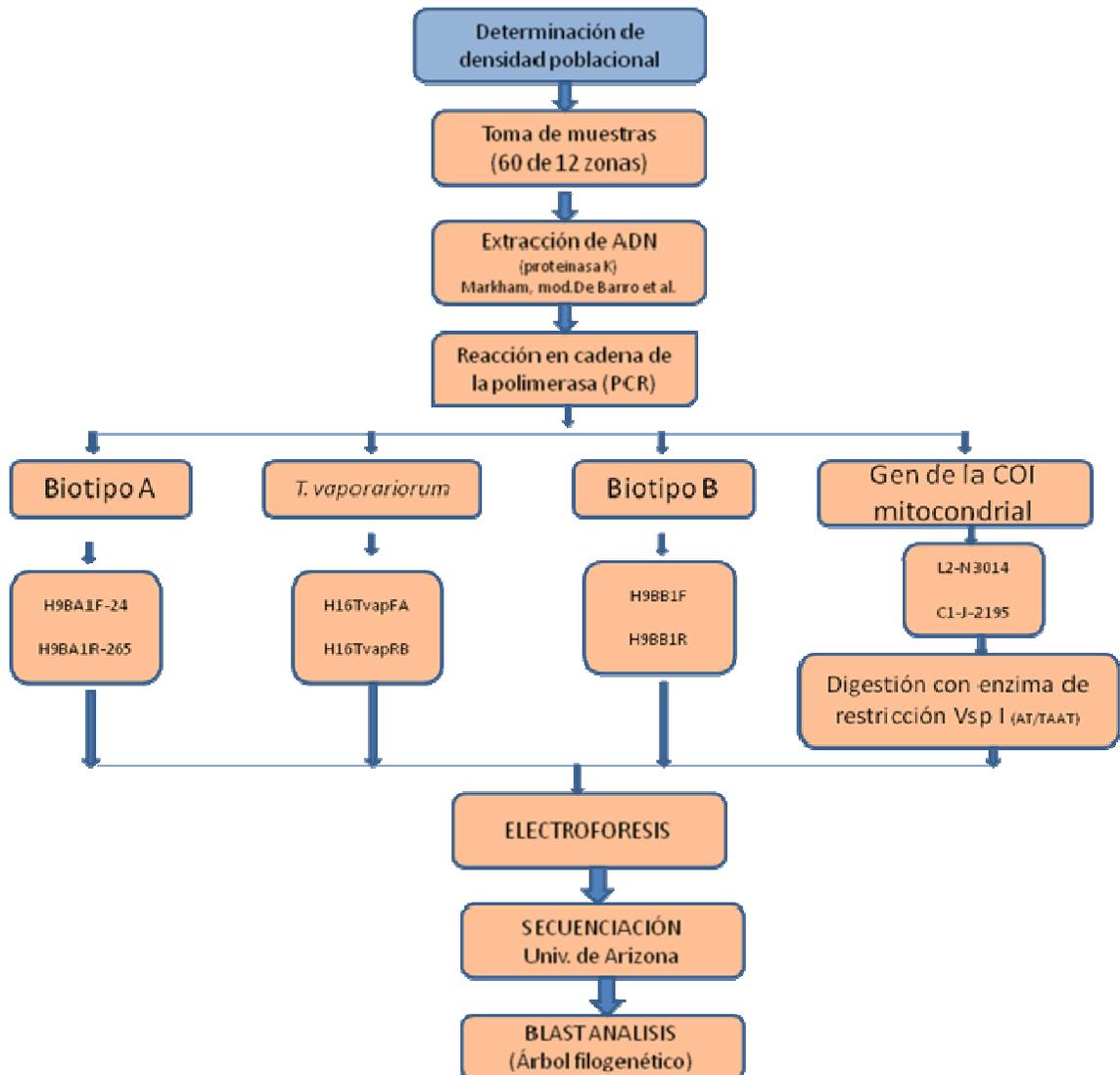


Figura 1. Diagrama de flujo que muestra la estrategia utilizada.

Cuadro 3. Zonas hortícolas muestreadas.

Valles Muestreados	Zona (Altura)	Maleza	Cultivo
El Paraíso	Araulí, Licana (580-960msnm)	<i>Euphorbia hirta</i> , <i>Euphorbia hypericifolia</i> , <i>Baltimora recta</i> , <i>Bidens pilosa</i> , <i>Cucurbita</i> , <i>Solanum torvum</i> , <i>Melampodium divaricatum</i> ,	<i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Capsicum annum</i> .
Copán	Quebrada Onda, Sabanetas, El Sitio San Gerónimo, El tránsito, El Rosario San Gerónimo. (600-1090msnm)	<i>Solanum torvum</i> , <i>Euphorbia heterophylla</i> , <i>Baltimora recta</i>	<i>Capsicum annum</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Manihot sculenta</i>
Ocotepeque	Sanceti, Sansira.	<i>Euphorbia hirta</i> , <i>Solanum torvum</i> , <i>Baltimora recta</i>	<i>Capsicum annum</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Cucumis sativus</i> .
Yoro	El Sitio, Punta de Ocote, Rancho Típico. (600-1100msnm)	<i>Euphorbia hirta</i> , <i>Bidens pilosa</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Capsicum annum</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Cucumis sativus</i>
Santa Bárbara	San Francisco de Ojuera, San Vicente, San Juan Seguaca, Santa Cruz, San Nicolás.	<i>Lantana camara</i> , <i>Baltimora recta</i> , <i>Euphorbia hirta</i> , <i>Lagascea mollis</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Capsicum annum</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i>
Manzaragua	Liquidambas, Frijolares	<i>Bidens pilosa</i> , <i>Lantana camara</i> , <i>Dalia sp.</i> <i>Tithonia tubaeformis</i> , <i>Heliantus sp.</i>	<i>Cyphomandra betacea</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Capsicum annum</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Calabaceracucurbita pepo</i> .
Cantarranas	Fincas de Javier Gaitán.	<i>Euphorbia hirta</i> , <i>Euphorbia hypericifolia</i> , <i>Bidens pilosa</i> , <i>Galinsoga urticaefolia</i> .	<i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Capsicum annum</i>
Lepaterique	La Brea, Quebrada Onda, Pueblo de Lepaterike, Ocote hueco	<i>Tithonia tubaeformis</i> , <i>Galinsoga urticaefolia</i> .	<i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Manihot esculenta</i> .
Talanga	Río Ondo, Monte Redondo (650-750msnm)	<i>Bidens pilosa</i> , <i>Tithonia tubaeformis</i> , <i>Galinsoga urticaefolia</i>	<i>Cucumis sativus</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Solanum melongena</i> .
Choluteca	Boquerón, Brisas del Calvario, San isidro, Las Cañas, San Marcos de Colón. (480-1010msnm)	<i>Euphorbia heterophylla</i> , <i>Baltimora recta</i> , <i>Melampodium divaricatum</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>Nicandra physalodes</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Capsicum annum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Manihot sculenta</i> .
Comayagua	Inversiones Mejía,	<i>Euphorbia hetrophylla</i> , <i>Heliamtus sp.</i> , <i>Solanum americanum</i>	<i>Cucumis sativus</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Solanum melongena</i>
El Zamorano EAP	Zona 2 y 3, Ensayos Dr. Rosas (800msnm)	<i>Galinsoga urticaefolia</i> , <i>Solanum americanum</i> , <i>Bidens pilosa</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> .

Las muestras fueron conservadas en 80% de etanol y posteriormente almacenadas a 4°C en el laboratorio de Diagnóstico Molecular de Patógenos de EAP Zamorano.

Identificación de los biotipos A, B y Q de *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* por PCR. La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito por Brown (1995) de la Universidad de Arizona. Se prepara una solución buffer de lisis la cual contiene Proteinasa K, una proteasa no específica de serina, usada para inactivar rápidamente las nucleasas endógenas como RN'asas, DN'asas de los tejidos (Invitrogen 2007). Una vez preparado el buffer de lisis, se añadieron 5 µl sobre una hoja de parafilm que cubrió un plato petri, en donde se maceró la mosca o la pupa con el envés de un microtubo de 0.5ml, una vez bien macerado se añadieron 35 µl más de buffer, se pipeteó y se colocó en un microtubo, obteniendo un total de 40 µl del buffer y la mosca o ninfa macerados. Los microtubos con el producto (ADN total de las moscas) fueron puestos en el termociclador a 65°C por 15 minutos, tiempo y temperatura necesarios para que actúe de forma eficiente la Proteinasa K, y a 95°C por 10 minutos para desnaturalizar el ADN.

Las 60 muestras fueron analizadas inicialmente con los primers para biotipo A. Las negativas resultantes fueron analizadas con los primers para biotipo B y las que no dieron positivas fueron analizadas con los primers para el Gen de la Citocromo Oxidasa mitocondrial (mtCOI) (Cuadro 4). Las muestras fueron digeridas después con la enzima de restricción VspI para cortar el gen amplificado en AT/TAAT y generar perfiles genéticos específicos que distinguen al biotipo Q.

Cuadro 4. Primers utilizados.

Primers	Código	Secuencia (5' a 3')	Gen	Origen
Biotipo A	H9BA1F-24 H9BA1R-265	TTT CAT CAC ACC GAC CAT GAC ATT ACG GCA TTG AAC TT	No publicado	CIAT
Biotipo B	H9BB1F H9BB1R	TGG TTT TTC ATG AAT GGG AGA AAA AAG CCG GAA GAA CCA TT	No publicado	CIAT
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	H16TvapFA H16TvapRB	AGA GAG ACC CAG CAC ATC GT AAA TAG AGA CCC AGC GCA AA	No publicado	Dr. Morales. CIAT
Biotipo Q	C1-J-2195 L2-N-3014	TTG TTT TTT GGT CAT CCA GAA GT TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A	Citocromo Oxidasa I mitocondrial (mtCOI)	Frohlich <i>et al.</i> 1999

CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT (Morales 2007, comunicación personal)¹, (Frohlich *et al.* 1999).

¹ Molares, F. 2007. Identificación de *Trialeurodes vaporariorum* (correo electrónico). Bogotá.

Cuadro 5. Perfil térmico de PCR para Biotipo A, B y *Trialeurodes vaporariorum*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5
Hibridización	62	2
Extensión inicial	72	3
Desnaturalización	94	1
Hibridización	62	1.30
Extensión	72	2
Extensión de adición	72	20
Ciclo final	4	∞

Fuente: Protocolos CIAT (Morales 2007)². ∞ Tiempo indefinido.

Cuadro 6. Perfil térmico de PCR para Biotipo Q.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	2
Desnaturalización	94	1
Hibridización	52	1
Extensión	72	1
Extensión de adición	72	7
Conservación	4	∞

Fuente: Khasdan *et al.* 2005. ∞ Tiempo indefinido.

Electroforesis. Para realizar la electroforesis se utilizó una gel de agarosa al 1% a 85 voltios, 500 mA, 60 minutos en geles pequeñas y 195 minutos en geles grandes. Para determinar el biotipo Q se usó primers que amplifican el gen de la Citocromo Oxidasa I mitocondrial (mtCOI) y este producto fue digerido con la enzima de restricción VspI, la cual corta el gen amplificado en la región AT/TAAT y muestra un patrón de dos bandas que caracterizan al biotipo Q.

Secuenciación. De las mismas muestras de las que se eligieron insectos para el análisis en Zamorano, se enviaron 10 moscas blancas para el análisis por PCR identificando el gen mtCOI y después para su secuenciación en la Universidad de Arizona. De esta manera se confirmaron los resultados obtenidos en Zamorano.

² Morales, F. 2007. Identificación de biotipos de moscas blancas (correo electrónico). Bogotá.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Densidades de moscas blancas. Se encontró una alta densidad de moscas blancas en tomate y pepino, pero también en malezas como *Euphorbia hirta*, *Parthenium hysterophorus* y en el género *Physalis*, aunque no estuvieran asociadas con cultivos hortícolas. Las malezas pueden actuar como hospederos (reservorios) de vectores de virus y permitir que éstos persistan aun en ausencia de cultivos. Generalmente los productores asocian altas densidades de moscas blancas con las infecciones virales (mal llamada virosis) que observan en el campo y proceden a realizar prácticas culturales como la aplicación desmedida de productos químicos o el uso de microtúneles o barreras físicas para evitar o eliminar éstos insectos. Se observaron densidades altas de moscas blancas en las zonas de: El Paraíso, Santa Bárbara, Manzaragua, Cantarranas, Choluteca y Comayagua; se observó una densidad media en las zonas de Talanaga y Zamorano; mientras que en Copán, Ocotepeque, Yoro y Lepaterique hubo una incidencia baja. Se encontró una mayor población de moscas blancas en los cultivos de tomate y pepino (Cuadro 7); las malezas donde siempre se observaron ninfas de moscas blancas fueron *Euphorbia hirta* y *Euphorbia hypericifolia*.

Cuadro 7. Densidad poblacional de moscas blancas por zonas.

Zona	Densidad
El Paraíso	4
Copán	2
Ocotepeque	1
Yoro	2
Santa Bárbara	3
Manzaragua	4
Cantarranas	4
Lepaterique	1
Talanga	3
Choluteca	4
Comayagua	4
Zamorano	2

(1) Menos de 10 ninfas por hoja, (2) hasta 20 ninfas por hoja, (3) hasta 50 ninfas por hoja, (4) hasta 100 ninfas por hoja.

De las 60 muestras de moscas blancas analizadas (Cuadro 8), 37 muestras (61.3%) fueron de la especie *Trialeurodes vaporariorum*, 16 individuos (26.6%) dieron positivos para el biotipo A de *Bemisia tabaci*, y ninguno fue del biotipo B o Q.

En el Laboratorio Brown de la Universidad de Arizona se detectó la presencia de la especie *Aleurodicus dugesii* (10%) (Figura 2, 3).

Normalmente la altura es un factor importante para la presencia de *Trialeurodes vaporariorum* ya que este tipo de moscas blancas se adaptan a regiones con alturas entre 950 y 3000 msnm, así como valles interandinos y zonas de ladera. Las temperaturas promedio a la cual suele vivir *Trialeurodes vaporariorum* va de 18 a 22 °C con humedades relativas superiores al 60%. También es necesario tener en cuenta que la intensidad de las lluvias es un factor importante en la dinámica poblacional de estas moscas blancas. (Cardona *et al* 2005). En este estudio se observó que en las zonas de El Paraíso, Ocoatepeque, Manzaragua, Cantarranas, Lepaterique, Talanga, Choluteca, Comayagua y Zamorano, zonas que en su mayoría están ubicadas a menos de 950 msnm, hay presencia de *Trialeurodes vaporariorum*, pese a que según sugiere la literatura no es el hábitat común de esta especie (Cuadro 8; Anexo 3).

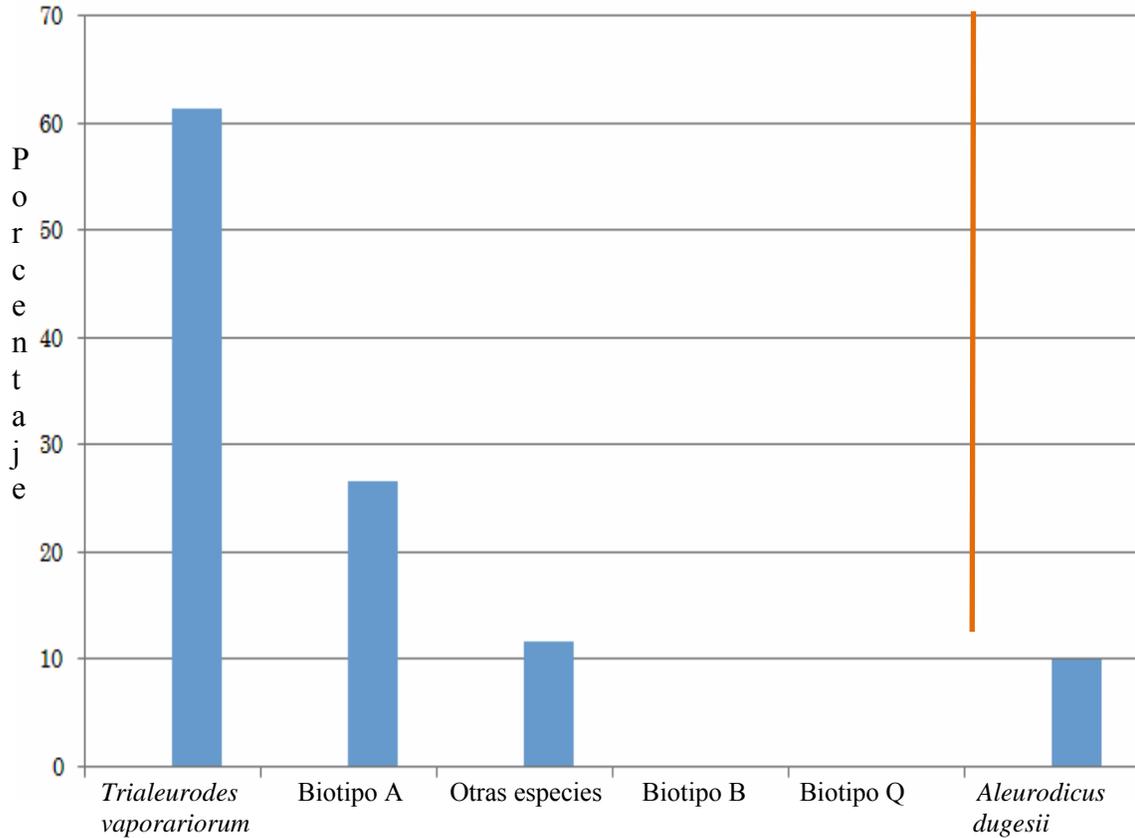


Figura 2. Porcentaje de moscas blancas detectadas por Zamorano y la Universidad de Arizona (*Aleurodicus dugesii*) caracterizado por secuencia de ADN.

Cuadro 8. Resultados del análisis de las moscas blancas recolectadas.

Zona	Número de muestras	Biotipo A	Biotipo B	Biotipo Q	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Otros	<i>Aleurodicus dugesii</i>
El Paraíso	5				5		
Copán	5					5	
Ocotepeque	5	3			2		
Yoro	5	5					
Sta. Bárbara	5	4				1	
Manzaragua	5				5		
Cantarranas	5				5		
Lepaterique	5				5		3
Talanga	5				5		
Choluteca	5	2			3		
Comayagua	5				4	1	3
Zamorano	5	2			3		
Total muestras	60	16	0	0	37	7	6
Porcentaje	100	26.6	0	0	61.3	11.6	10*

♣ Resultado de las muestras analizadas en el laboratorio de Zamorano y en el laboratorio Brown de la Universidad de Arizona (2007)³.

³ Brown, J. 2007. Resultados de las secuencias, filogenia BLAST Análisis (correo electrónico) Tucson, AZ.

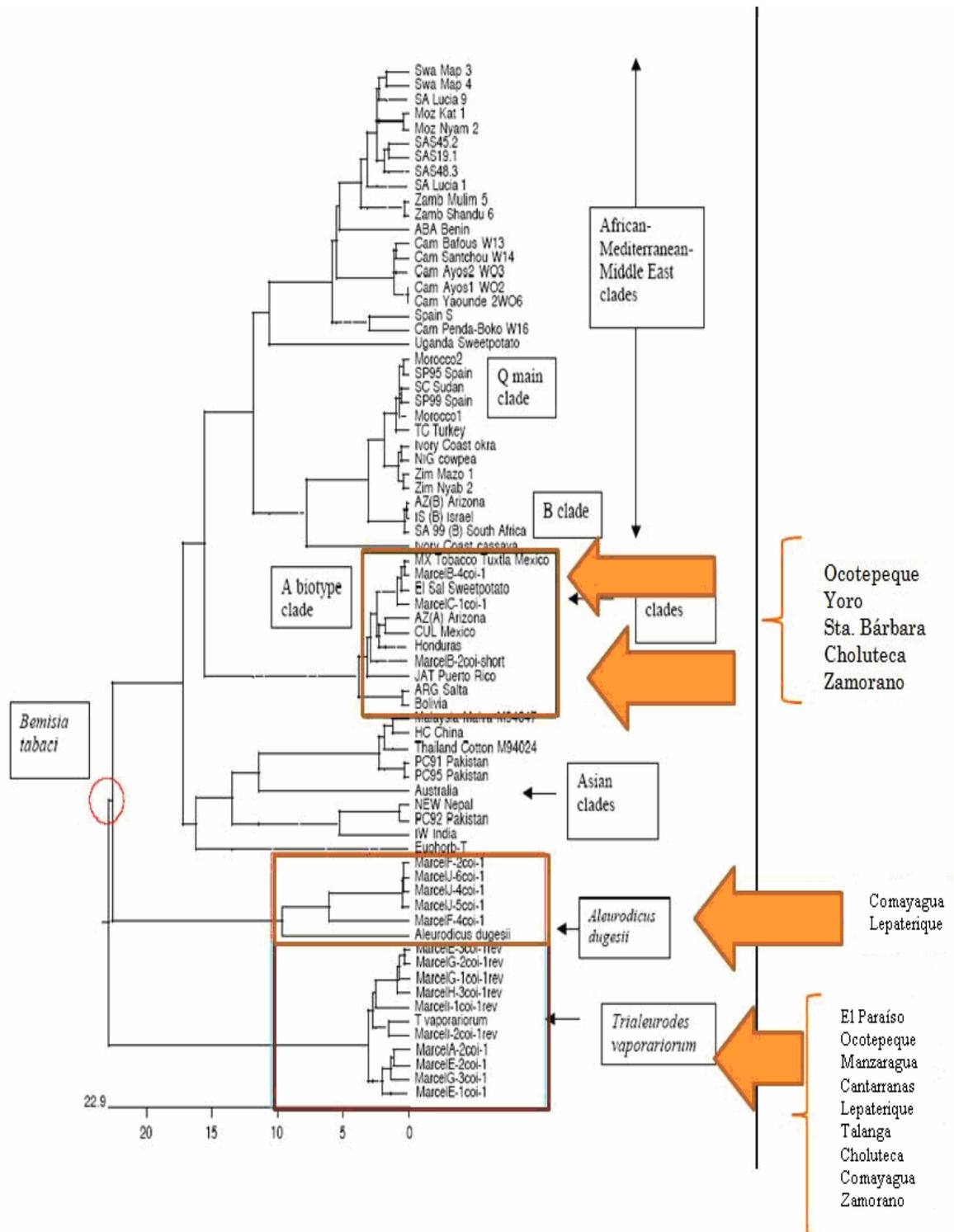


Figura 3. Estudio filogenético de muestras. Cortesía laboratorio Brown. Universidad de Arizona (2007)⁴.

⁴ Brown, J. 2007. Resultados de las secuencias, filogenia BLAST Análisis (correo electrónico) Tucson, AZ.

PCR y Electroforesis. El producto de PCR (600 pb) para el biotipo A es claramente visible confirmando la presencia de este biotipo (Figura 2). Los resultados obtenidos para el biotipo A concuerdan con los reportados por Caballero (1994). Las muestras analizadas con el primer para biotipo B, no amplificaron ningún producto de PCR, sólo se amplificó el control. Las muestras analizadas con los primers para *Trialeurodes vaporariorum* amplificaron un producto de PCR de 580 pb; pero también se pudo observar la presencia de otro producto (540 pb) muy cercano a la amplificada por el control positivo. Esto sugirió que no se trataba de *Trialeurodes vaporariorum* sino de otra especie (Figura 3); la literatura reporta (MyLo *et al.* 2004.) que la especie *Aleurodicus dugesii* esta íntimamente relacionada a *Trialeurodes vaporariorum* ya que la única diferencia en el gen de la mitocondria, es una transposición del gen G del ARN de transferencia (tRNA-G) (Figura 5), lo que sugiere que el producto amplificado junto con *Trialeurodes vaporariorum* corresponde a *Aleurodicus dugesii* (Figura 4).

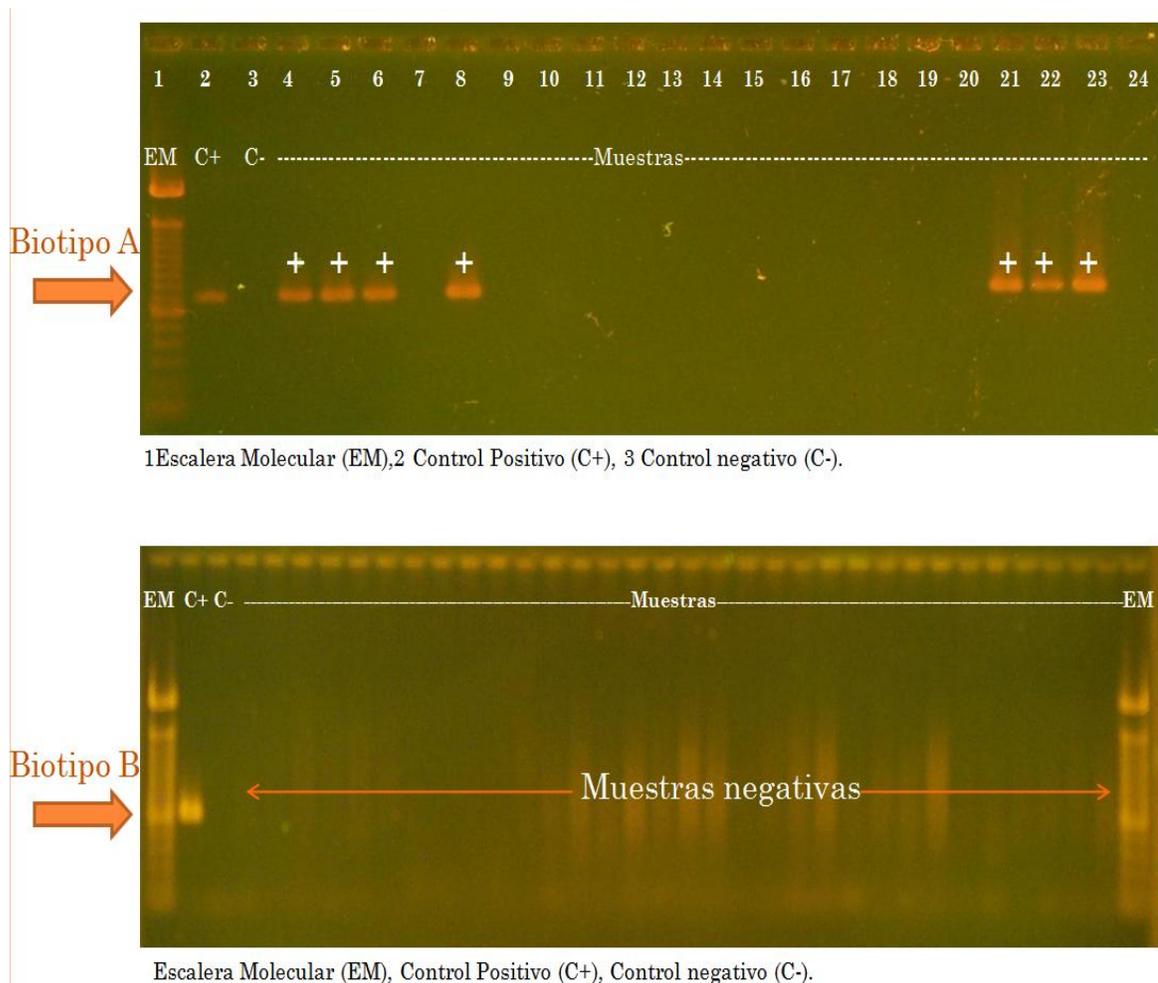


Figura 4. Gel obtenida en los análisis de los biotipos A y B.

Trialeurodes vaporariorum

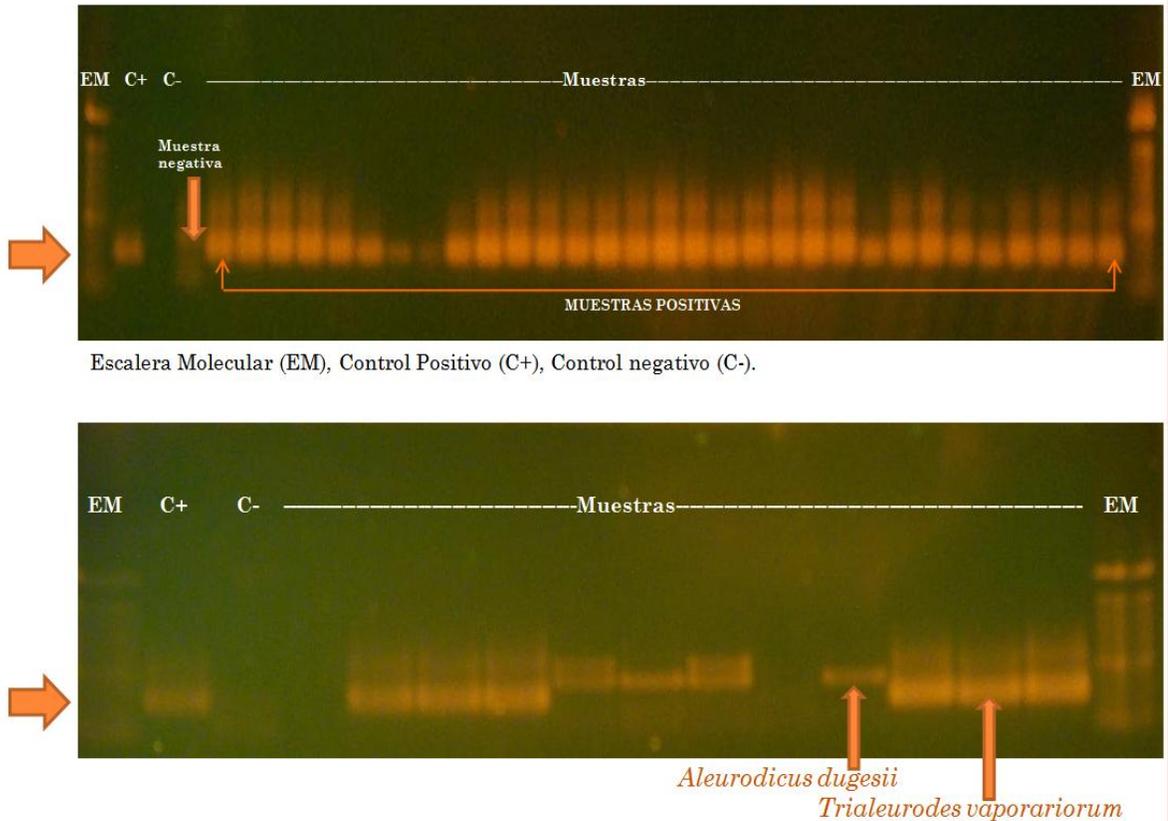


Figura 5. Gel de *Trialeurodes vaporariorum*.

Transposición del gen G del ARN de transferencia (tRNA-G)



Figura 6. Relación filogenética entre *Trialeurodes vaporariorum* y *Aleurodicus dugesii*.

Las dos muestras restantes al ser analizadas con los primers para el gen mtCOI resultaron positivas, pero al ser digeridas por la enzima de restricción VspI no dieron el patrón esperado para el biotipo Q. (Figura 5).

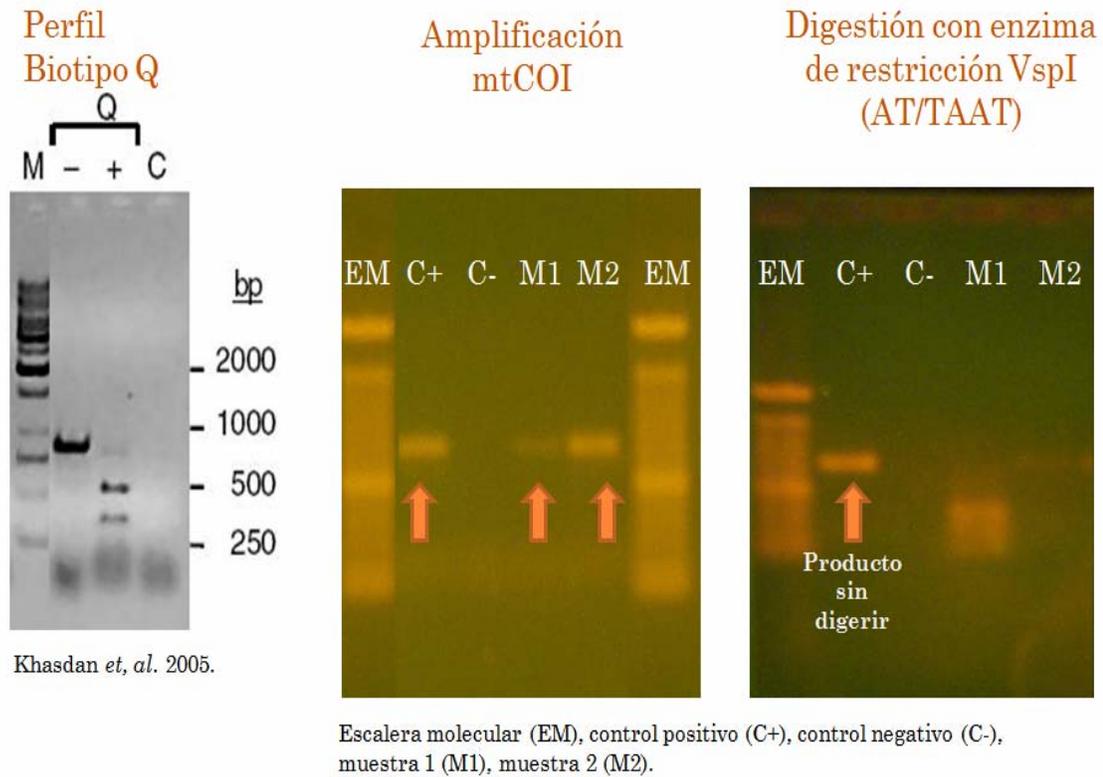


Figura 7. Patrón obtenido para el biotipo Q.

CONCLUSIONES

1. Se encontró una variabilidad en la densidad poblacional de las moscas blancas dependiendo de las zonas estudiadas.
2. Los productores continúan asociando la presencia de moscas blancas con las infecciones virales.
3. No se encontró una alta población de *Bemisia tabaci*, transmisoras de Begomovirus, en las zonas muestreadas y sólo se encontró el biotipo A, los biotipos B y Q están ausentes.
4. La principal especie de moscas blancas identificadas fue *Trialeurodes vaporariorum* que no transmite Begomovirus.
5. Se confirmó que *Aleurodicus dugesii* está presente en Honduras sin embargo este insecto no transmite ningún virus conocido

RECOMENDACIONES

1. Ampliar la zona de estudio, el número de muestras analizadas en otras épocas del año, en más cultivos y en diferentes ciclos del cultivo.
2. Informar estos resultados a los programas de extensión para romper el mito de que la mayoría de las “virosis” en Honduras se deben al complejo “Geminivirus-mosca blanca”.
3. Realizar el estudio en verano cuando las densidades de moscas blancas son altas.

LITERATURA CITADA

Bedford, I; Briddon, R; Brown, J; Rosell, R; Markham, P. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology* 125: 311-325.

Bird, J. 1957. A whitefly-transmitted mosaic of *Jatropha gossypifolia*. Technical Paper of the Agricultural Experiment Station of Puerto Rico 22:1-35.

Brown, J. 1994. Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agroecosystems worldwide. *FAO Plant Protection Bulletin* 42(1-2): 3-32.

Brow, J; Bedford, I; Bird, J; Costa, H; Frohlich, D; Markham, P. 1995. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochemical Genetics* 33:205-213.

Brown, J; Bird, J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean Basin: Past and present. *Plant Disease* 76: 220-225.

Brown, J; Frohlich, D; Rosell, R. 1995. The Sweetpotato or Silverleaf Whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a Species Complex. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 511 - 534.

Bush, G. 1993. *Bemisia tabaci*; Biotype or species complex. In Memoria II Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Managua, Nic. p. 17-26.

Caballero, R. 1992. Whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) from Central America and Colombia including slide, mounted pupal and field keys for identification, field characteristics, hosts, distribution, natural enemies and economic importance. Tesis M. Sc. Manhattan, EEUU, Kansas State University. 201 p.

Caballero, R. 1994, Clave de Campo Para Inmaduros de Moscas Blancas de Centro América (Homoptera: Aleyrodidae). DPV-EAP Zamorano, Hn. 4 p.

Caballero, R; Rueda, A. 1993. Las moscas blancas en Honduras. Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América central y el Caribe. Memoria del taller Centroamericano y del Caribe sobre moscas blancas. ED. CATIE. Turrialba. C.R. 53 p.

Cardona, C; Rodríguez, I; Bueno, J; Tapia, X. 2005. Biología y Manejo de la Mosca Blanca *Trialeurodes vaporariorum* en Habichuela y Frijol. CIAT (Centro Internacional de

agricultura Tropical, CO). DFIO (Department for international Development, CIAT) no. 345. Cali, Colombia. 51 p.

Dávila Olivas, N. 2007. Identificación molecular y serológica de infecciones virales en zonas de producción hortícola en Honduras, Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 35 p.

Frohlich, D; Torres, I; Bedford, I; Markham, P; Brown, J. 1999. A phylogenetical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Biology* 8: 1683-1691.

Gerling, D; Orion, T; Delarea, Y. 1990. Eretmocerus penetration and immature development: a novel approach to overcome host immunity. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 13: 247 – 253.

Hilje, L. 1996. Congreso Nacional Agronómico (X, 1996, Costa Rica). 1996. Posibilidades para el Manejo Integrado del Complejo *Bemisia tabaci*-Geminivirus en Costa Rica. Hilje, L. Turrialba, CR; CATIE. p. 21-23.

Hilje, L. 2004. Conocimiento Bioecológico como fundamento para el manejo de la Mosca Blanca (*Bemisia Tabaci*): Experiencias en América Latina. CATIE. Turrialba, CR. 9 p.

Horowitz, A; Kontsedalov, S; Khasdan, V; Ishaaya, I. 2005. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Archives of European Journal Biochemistry and Physiology* 58: 216-225.

Invitrogen. 2007. Catálogo, Database. Consultado 01 may. 2007. Disponible en: <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=1>

Khasdan, V; Levin, I; Rosner, A; Morin, S; Kontsedalov, S; Maslenin, L; Horowitz, A. 2005. DNA markers for identifying biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleiroididae) and studying population dynamics. *Bulletin of Entomological Research.* 95: 605-613.

Mitidieri, M; Polack, L. 2005. Guía de reconocimiento de plagas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). San Pedro. Consultado 01 may 2007. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/Sanpedro/info/doc/2005/mm_0506plag.htm

Mullis, K. 1982. "The unusual origin of the polymerase chain reaction". *Scientific American* 262 (4): 56-61, 64-5.

Muñoz, R; Pitty, A. 1994. Guía Fotográfica para la Identificación de Malezas Parte I. Departamento de Protección Vegetal EAP Zamorano. CERED. 124 p.

MyLo, L; Bauman, L; Bauman, P. 2004. Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). BioMed. Evolutionary Biology. University of California. CA, USA.

Pest Alert FDACS-DPI. 2005. Primera notificación del biotipo Q de *Bemisia tabaci* en Estados Unidos. Florida, EEUU. Consultado 09 may. 2007. Disponible en: <http://www.pestalert.org/espanol/viewArchNewsStory.cfm?nid=339>

Pitty, A; Molina, A. 1998. Guía fotográfica para la Identificación de Malezas: Parte II. DPV-EAP#660. Zamorano Academic Press. 136 p.

Plant Viruses Online. 2007. Descriptions and List from the VIDE Database. Consultado 01 may. 2007. Disponible en: <http://image.fs.uidaho.edu/vide/genus009.htm>

Roca, MM; Casco, D; Flores, E; Aguilar, E; Valenzuela, J. 2006. Validación de prácticas para el manejo de mosca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Honduras Informe CIAT 2006, Zamorano. 2006.

Roca, MM; Casco, D; Flores, E; Aguilar, E; Valenzuela, J. 2007. Validación de prácticas para el manejo de mosca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Honduras Informe CIAT 2007, Zamorano. 2007.

Virus Taxonomy. 2007. Descriptions and List from the VIDE Database. Consultado 01 may. 2007. Disponible en: <http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll?f=templates&fn=main-h.htm>

ANEXOS

Anexo 1. Cuadro de diferencias entre *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*

Estructura	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	<i>Bemisia tabaci</i>
Pupa	Oval, plana y casi transparente con hilos de cera largos y erectos	De color amarillo, forma de domo y bordes generalmente con escasos o nulos filamentos cerosos.
Adulto	Adulto más grande forma triangular visto desde arriba con alas en posición plana sin hendidura entre las mismas, cuerpo blancuzco	Pequeño forma de bastón visto desde arriba con alas en posición de "techo a dos aguas", hendidura entre las alas que permite ver el cuerpo de color más amarillento

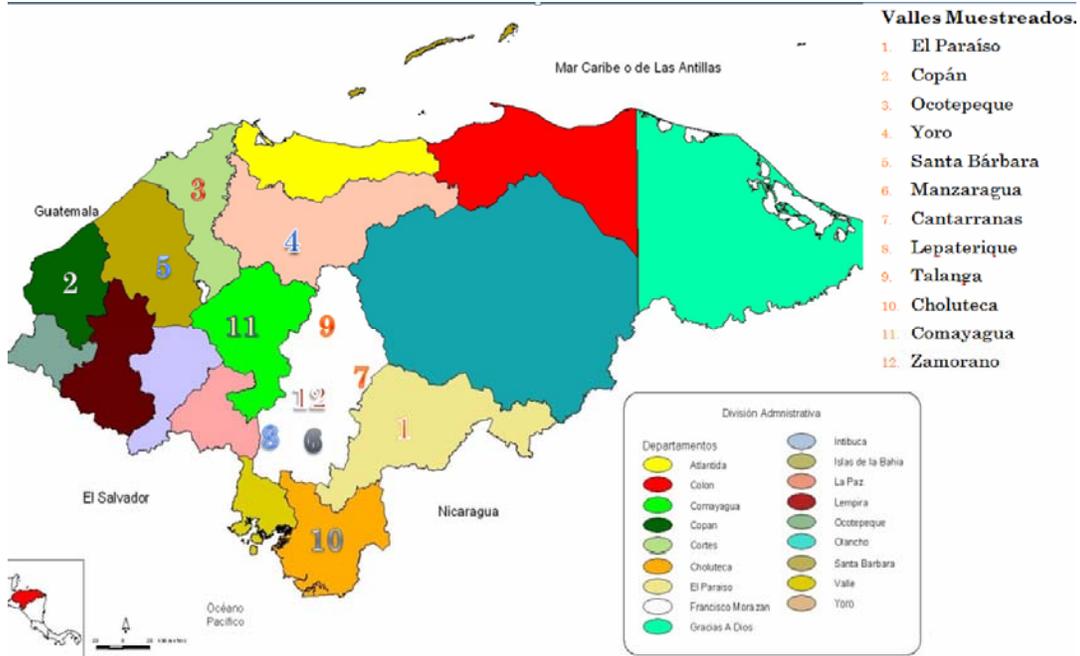
Fuentes: Cardona *et al.* 2005; Flores *et al.* 1960; Mitidieri y Polack 2005.

Anexo 2. Reactivos usados para la extracción de AND de las moscas blancas.

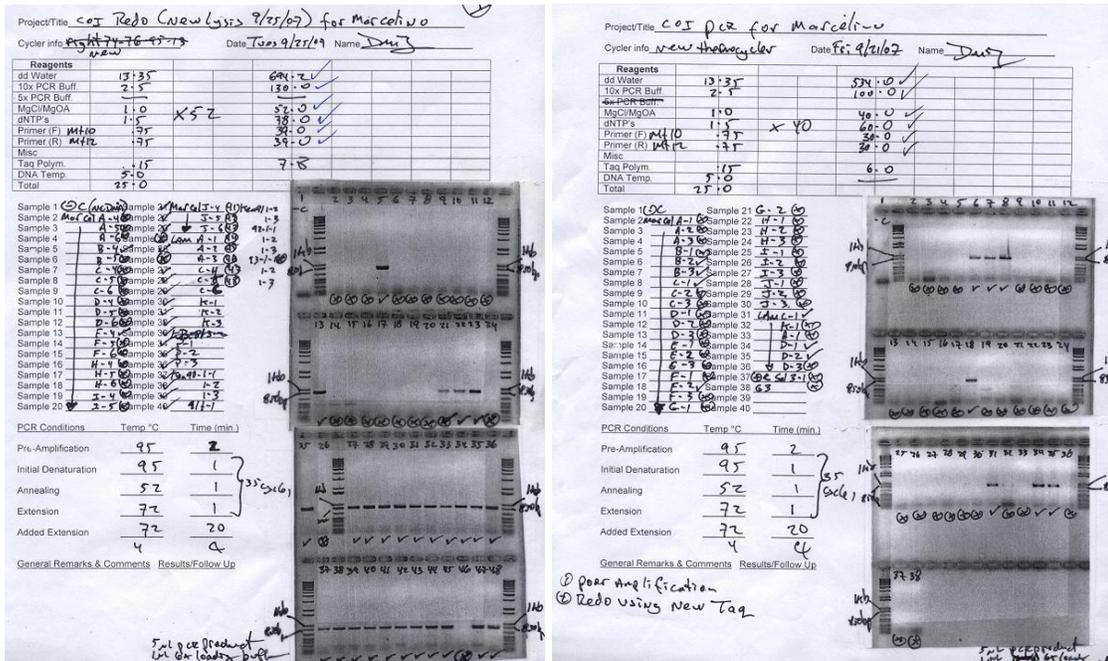
Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen de 1ml
0.5M EDTA-8.0	0.5 mM	1 μ l
1M Tris-HCl pH-8.0	5 mM	5 μ l
Nonident P-40	0.5 %	5 μ l
Proteinasa K	1.0 mg/ml	0.001 g
dH2O		989.0 μ l
Total		1000 μl

Fuente: Protocolos del Laboratorio de la Dra. Judith Brown Universidad de Arizona (2007)⁵.

⁵ Brown, J. 2007. Protocolo para extracción de ADN (correo electrónico). Tucson, AZ.

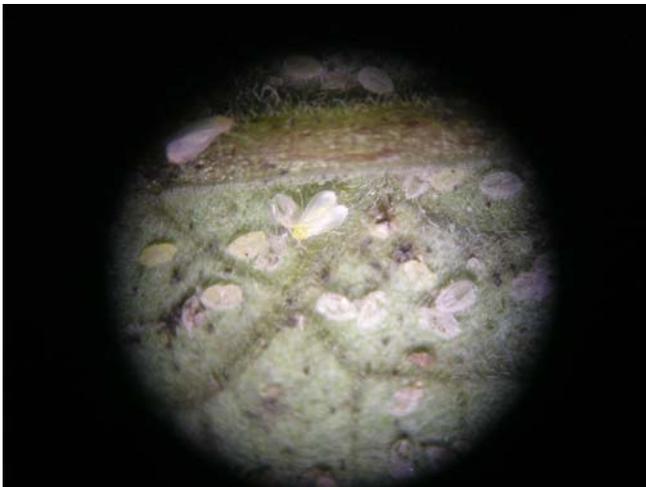


Anexo 3. Mapa de las 12 zonas hortícolas muestreadas.



Anexo 4. Resultados de PCR para mtCOI, cortesía de Universidad de Arizona, Laboratorio Brown (2007)⁶.

⁶ Brown, J. 2007. Resultados de PCR de muestras para mtCOI (correo electrónico). Tucson, AZ.



Anexo 5. Fotografías de ninfas y adultos de moscas blancas