

Identificación molecular y serológica de infecciones virales en zonas de producción hortícola en Honduras

Nelson Horacio Dávila Olivas

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Diciembre, 2007

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Identificación molecular y serológica de
infecciones virales en zonas de producción
hortícola en Honduras**

Tesis presentada como requisito parcial
para optar al título de Ingeniero Agrónomo
en el grado académico de Licenciatura.

Presentado por:

Nelson Horacio Dávila Olivas

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.

Nelson Horacio Dávila Olivas

Honduras
Diciembre, 2007

Identificación molecular y serológica de infecciones virales en zonas de producción hortícola en Honduras.

Presentado Por:

Nelson H. Dávila Olivas

Aprobado por:

María Mercedes Roca, Ph.D.
Asesor Principal

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

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor Secundario

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Estela Aguilar, M.Sc.
Asesor Secundario

Kenneth L. Hoadley, D.B.A
Rector

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador de Fitotecnia.

DEDICATORIA

A DIOS por ser fuente de inspiración y sabiduría, por guiarme en los momentos buenos y consolarme en los malos, por compartir este sueño conmigo.

A mis padres Orlando de Jesús Dávila Medrano y Dora Azucena Olivas Hernández quienes me han dado su apoyo incondicional en todo momento.

A la familia Castilblanco Flores por su apoyo y motivación, muy especialmente al Ingeniero José Benito Castilblanco, quién me motivo a vivir esta inolvidable escuela de vida llamada Zamorano.

A mi hermana Brenda Dávila por su cariño y motivación.

Y a todos esos angelitos que DIOS puso en mi camino durante estos cuatro años en Zamorano, a los que simplemente prefiero llamar amigos: Andrés, Linda, Lucía, Vivian, Ronald, Loren, David, Hilda, Julia, Mario, Pablo, Guerrón, Yuri, Victor y Lucilizabeth.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora María Mercedes Roca, por su apoyo, colaboración y aportes en la elaboración de este estudio.

A Estela Aguilar por sus consejos, por haber trabajado a mi lado en cada momento durante este proyecto, por sus horas extras invertidas y por las noches de desvelo que tuvimos que pasar para poder concluir con el estudio.

Al Dr. Alfredo Rueda por su sabiduría y por sus aportes valiosos en el desarrollo del estudio.

A la Lic. Débora Casco quién estuvo a mi lado durante el muestreo del estudio.

A Loren Rivera por haber colaborado conmigo dentro del experimento y por invertir su tiempo libre en ayudarme.

A Lucía Orantes y Marcelino Guachambala, mis compañeros de laboratorio, quienes de una u otra forma colaboraron con mi tesis.

A mis compañeros de cuarto durante estos 4 años, Yalmar, Ricardo, David y Juan Cueva y a toda la clase Centauro 07 por haber compartido cuatro años de grandes experiencias, giras, alegrías y tristezas.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A los Programas IPM-CRSP, PROMIPAC y EDA/MCC por haber financiado este estudio.

A la República de China - Taiwán por haber financiado mis estudios en Zamorano.

RESUMEN

Dávila Olivas, Nelson H. 2007. Identificación molecular y serológica de infecciones virales en zonas de producción hortícola en Honduras, Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 40 p.

Las infecciones virales en Centroamérica son el principal problema biótico que enfrentan los productores de hortalizas. Las empresas de agroquímicos promueven el uso de antibióticos ya que asocian muchas de las infecciones a fitoplasmas. El TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus) del género Begomovirus, familia Geminiviridae, es uno de los virus de mayor importancia en el mundo. Los objetivos de este estudio fueron determinar si Honduras continua libre del TYLCV, conocer la incidencia de las infecciones virales para el año 2007 y determinar si algún tipo de fitoplasma es responsable de las patologías observadas en los cultivos de chile y tomate. Entre junio y agosto de 2007 se recolectaron 299 muestras de 19 cultivos, incluyendo chile y tomate, procedentes de 12 regiones de Honduras. Se utilizó la técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) para determinar la presencia de Begomovirus, TYLCV y fitoplasmas. Para el análisis de TMV (Virus del Mosaico del Tabaco), CMV (Virus del Mosaico del Pepino) y Potyvirus se utilizaron kits de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). En chile no se encontraron muestras positivas a Begomovirus, fitoplasma, potyvirus, CMV o TYLCV y sólo 10% de las muestras resultaron positivas a TMV. Del 90% se desconoce el agente infeccioso. En tomate el 20% resultaron positivas a TMV, el 70% restante presentaron infecciones combinadas de CMV y TMV. Potyvirus resultó positivo en 16% de las muestras (ayote, pepino, pepino peludo, malezas y en 0.04% de las muestras de tomate). Sólo un 0.01% (fríjol y malezas) fueron positivas para geminivirus. La baja incidencia de geminivirus se puede explicar con la época de muestreo, ya que en la estación lluviosa es cuando hay menor presión del complejo Begomovirus - mosca blanca. Los resultados sugieren que Honduras se puede seguir declarando libre del TYLCV, ninguno de los síntomas observados en chile y tomate puede ser atribuido a fitoplasmas. La etiología de los síntomas observados en los cultivos de chile continúan siendo desconocidos. Los productores deben adoptar estrategias de manejo para el control de TMV, ya que es un virus de transmisión mecánica.

Palabras clave: Áfidos, mosca blanca, nested PCR, vector, virosis común, transmisión mecánica.

CONTENIDO

Portadilla.....	ii
Autoría.....	iii
Página de firmas	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos.....	vi
Agradecimientos a patrocinadores	vii
Resumen	viii
Contenido	ix
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras	xi
Índice de anexos	xii
 INTRODUCCIÓN.....	 1
MATERIALES Y MÉTODOS	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
CONCLUSIONES	13
RECOMENDACIONES	14
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
ANEXOS	17

ÍNDICE DE CUADROS

1. Distribución de muestras por zona y cultivo.	4
2. Perfil térmico de primers para Begomovirus, TYLCV y fitoplasmas.....	5
3. Secuencias de Primers utilizados para detectar Begomovirus, TYLCV y fitoplasmas.....	6
4. Porcentaje de muestras positivas a Potyvirus por zona de muestreo.....	10
5. Muestras de chile y tomate analizadas para Begomovirus y fitoplasmas	10
6. Muestras de chile y tomate analizadas para TMV y CMV	11
7. Cambio en la incidencia de infecciones virales del 2001 al 2007	11

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Mapa de zonas de muestreo.....	3
2. Prueba rápida de ELISA de fluido lateral mostrando resultados negativos para CMV y positivos para TMV	7
3. Gel de agarosa al 1% mostrando productos positivos con los primers PAL1v1978 y PAR1c496	8
4. Gel de agarosa al 1% mostrando productos negativos con los primers V61 y C473	9
5. Placas de ELISA indirecta utilizadas en la detección de Potyvirus	9
6. Cambio en la incidencia de Begomovirus en Chile y tomate de 2001 al 2007	12

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Protocolo de extracción de ADN para geminivirus y fitoplasmas	17
2. Protocolo para pruebas de ELISA de fluido lateral proporcionado por AGDIA	18
3. Protocolo para pruebas de ELISA indirecta con el marcador de la alcalina fosfatasa para la detección de Potyvirus proporcionado por AGDIA	18
4. Diagrama de ubicación de muestras en pruebas de ELISA indirecta.....	21
5. Solución maestra (Master Mix) para las reacciones de PCR para Fitoplasma...	21
6. Solución maestra (Master Mix) para las reacciones de PCR para Geminivirus.	22
7. Distribución de zonas de muestreo y cultivos asociados.....	23
8. Incidencia y severidad promedio de infecciones virales en chile en las zonas de muestreo.....	24
9. Incidencia y severidad promedio de infecciones virales en tomate de las zonas de muestreo.....	24

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades virales continúan siendo la principal causa de las pérdidas por factores bióticos en cultivos hortícolas en Honduras y otros países de Centro América. Debido a la gran diversidad de virus, formas de transmisión y vectores, es difícil conocer y establecer un manejo adecuado para la producción hortícola (Brown 1995).

La incidencia y severidad de las infecciones virales, es variable, así como la etiología de los virus y los vectores involucrados. La dinámica de las infecciones virales obedece a la época del año o ciclo, al cultivo en cuestión, a las prácticas culturales utilizadas, a los sistemas agrícolas de la zona (cultivos vecinos y monocultivos con riego) y a los factores ambientales que influyen la dinámica poblacional de los vectores. Es imposible determinar la etiología u origen de una infección viral, observando los síntomas en el campo; es necesario realizar pruebas de laboratorio ya que muchas veces pueden existir infecciones mixtas en la misma planta (Roca *et al.* 2006).

Desde la década de los noventa, las pérdidas de la producción hortícola causada por infecciones virales, han sido atribuidas al complejo mosca blanca-geminivirus, y se ha estimado que las reducciones en rendimiento llegan a un 70% (Caballero y Rueda 1993). Estudios posteriores reportan una reducción en rendimiento hasta en un 100%. En Honduras, las infecciones virales son las responsables del abandono de zonas de producción hortícola como el valle de Comayagua¹.

Las infecciones virales de cultivos hortícolas como tomate y chile, son en su mayoría atribuidas a Begomovirus, Virus del Mosaico del Pepino (CMV), Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), Potyvirus y Tospovirus (Lastres *et al.* 2007). En el tomate las infecciones virales son atribuidas mayormente a Begomovirus y TMV. En contraste, estudios realizados por Zamorano reportan entre 71 y 90% de infecciones virales de etiología desconocida en el cultivo del chile (Roca *et al.* 2007).

Geminivirus es un término comúnmente utilizado para designar a virus del género Begomovirus que pertenece a la familia Geminiviridae (Brown 1995). El TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus), es uno de los Begomovirus de mayor importancia en el mundo y principal factor limitante de la producción de tomate en Israel. Es el único virus de este grupo introducido del viejo mundo a América y se transmite de forma persistente por la mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Polston y Anderson 1994).

¹ Roca, M.M. 2007. Incidencia de infecciones virales (entrevista). Zamorano, HN, Escuela Agrícola Panamericana.

El TYLCV se ha dispersado en los últimos 20 años en los climas tropicales y subtropicales, fue detectado por primera vez en América en 1992 en República Dominicana y posteriormente en Cuba, México, España, Portugal y Florida (Padidam *et al.* 1995). En Honduras, hasta el momento no ha sido reportado (Roca *et al.* 2006). Sin embargo, es necesario mantenerse alerta y realizar sondeos periódicos.

En las últimas dos décadas se ha abusado de los agroquímicos para controlar a los insectos vectores de virus, creando problemas de resistencia, contaminación ambiental y daños a la salud humana. A pesar de las múltiples aplicaciones de agroquímicos, las infecciones virales continúan persistiendo en el campo. Algunas compañías de agroquímicos, atribuyendo los síntomas observados en el campo a infecciones causadas por fitoplasmas y no por virus, han fomentado el uso de antibióticos agrícolas en México y Centroamérica. Sin embargo, estas aseveraciones no han sido respaldadas por estudios serios que incluyan pruebas de laboratorio con técnicas moleculares (Roca *et al.* 2006).

La punta morada de la papa es una de las enfermedades más comunes asociadas a fitoplasmas en América y está presente en Honduras (Roca *et al.* 2006). Otra de las enfermedades clásicas causadas por fitoplasmas, es el Stolbur, solamente reportada en Europa. Sin embargo, Zamorano ha realizado estudios en varios países de Centroamérica que confirman la ausencia de fitoplasmas en tomate (Toruño Calero 2005).

Debido a la importancia de conocer la etiología de la enfermedades como factor principal para un manejo apropiado, el objetivo de este estudio 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 Potyvirus.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo se hizo en cinco fincas provenientes de 12 zonas de producción hortícola en Honduras (Figura 1): El Paraíso, San Marcos de Colón, Ocotepeque, Copán, Zamorano, Comayagua, Lepaterique, Guinope, Cantarranas, Talanga, Yoro y Santa Bárbara (Cuadro 1).

Se hicieron encuestas rápidas a los productores de las fincas antes de realizar el muestreo con el objetivo de conocer las condiciones en las que se desarrollaron las infecciones virales observadas en el campo.

La recolección de muestras se llevó a cabo de junio a agosto de 2007. Se recolectaron un total de 299 muestras de brotes y hojas jóvenes de plantas con síntomas clásicos de virus que incluyen clorosis, arrugamiento foliar y achaparramiento. Durante el muestreo se establecieron de tres a cinco patrones de síntomas por finca y se tomaron muestras representativas de cada tipo de síntoma, luego se documentaron con fotografías digitales.

Para conservar las muestras, se colocaron en papel toalla (dentro de un libro grueso). Una vez que las muestra fueron trasladadas al laboratorio, se colocaron en una prensa de herbario, para ser desecadas y luego documentadas nuevamente por fotografías digitales.



Fuente: Desconocido, Adaptado por el autor.

Figura 1. Mapa de zonas de muestreo.

↓: Región muestreada.



Cuadro 1. Distribución de muestras por zona y cultivo.

Cultivo	Zona de muestreo												Total
	PAR	SMC	OCO	COP	ZAM	COM	LEP	GUI	CAN	TAL	YOR	SAB	
Tomate	5	5	4	2	10	0	1	7	24	5	13	8	84
Chile	2	0	6	0	2	9	3	5	12	0	12	8	59
Berenjena	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	10
Papa	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Pepino	0	0	3	2	2	6	0	0	0	16	0	2	31
Pepino Peludo	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4
Ayote	0	0	3	3	0	0	0	1	0	0	0	0	7
Pataste	0	0	0	3	0	0	6	0	0	0	0	0	9
Calabaza	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Chayote	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4
Sandía	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Frijol	0	0	5	0	3	0	2	3	0	0	7	1	21
Caupí	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	7
Maní Forrajero	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	9
Yuca	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
Flor de Jamaica	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Café	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	4
Gliricidia	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Maleza	0	7	0	0	3	1	10	1	1	0	11	7	41
Total	7	12	23	10	28	34	23	21	37	30	44	30	299

0: No se tomó muestra. PAR: El Paraíso. SMC: San Marcos de Colón. OCO: Ocotepeque. COP: Copán. ZAM: Zamorano. COM: Comayagua. LEP: Lepaterique. GUI: Guinope. CAN: Cantarranas. TAL: Talanga. YOR: Yoro. SAB: Santa Bárbara.

I. Diagnóstico molecular para Begomovirus y fitoplasmas

Extracción de ADN. Se pesó 0.10 g de tejido en una balanza analítica² y se utilizó el protocolo de extracción para geminivirus descrito por Gilbertson *et al.* (1991). Brevemente, el método consiste en macerar el tejido en un buffer de extracción (EDTA 0.05 M, NaCl 0.5 M y B-ME 0.01 M), después se transfiere el macerado a un tubo eppendorf. A continuación, se añaden 90 µl de SDS 10%, se incuba el tubo por 10 minutos a 65°C, luego se agrega 150 µl de acetato de sodio 5M, pH 5.5.

La centrifugación se hizo a 14000 rpm durante 10 minutos³. El protocolo continua con la recolección del sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, se agrega isopropanol 1:1 y se centrifuga nuevamente por 10 minutos a 14000 rpm. El proceso termina con el lavado del pellet de ADN con etanol 70%, secado y resuspendido en agua bi-destilada estéril.

² Balanza analítica PM 100, Mettler Instrument Corp. Hightstown, New Jersey.

³ Centrífuga 5415C, Brinkmanm Instrument, Inc. Cantigue Road, Westbury, N.Y. 11590

PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa). Los primers utilizados en el experimento se compraron en INVITROGEN ® Company (www.invitrogen.com). Los controles para fitoplasmas y geminivirus se obtuvieron de muestras positivas y negativas existentes en el laboratorio de diagnóstico molecular de enfermedades de Zamorano. Adicionalmente, los controles para TYLCV se obtuvieron del laboratorio de diagnóstico de Ohio State University.

La reacción de PCR para Begomovirus se hizo con los primers PAL1v1978/ PAR1c496 (Rojas *et al.* 1993) (Cuadro 2). Se usaron las 299 muestras recolectadas, de las cuales 59 fueron de chile y 84 de tomate. Las muestras que resultaron positivas para Begomovirus se analizaron para TYLCV con los primers V61/C473 (Navot *et al.* 1991).

Se hizo un análisis de fitoplasmas en 143 muestras, 59 de chile y 84 de tomate. Los primers utilizados fueron R16F2n/R16R2 (Gundersen *et al.* 1996). Los productos de PCR obtenidos con los primers anteriores, se diluyeron 1:10 y se sometieron a una segunda amplificación (nested PCR) con los primers rU3/fU5 (Lorenz *et al.* 1995) (Cuadro 2).

Para el proceso de PCR se utilizó un Termociclador PERKINELMER 480, Serial number: 801N6042410. U.S. Instrument Division Norwalk, CT 06859 USA.

Análisis de los productos de PCR. Se cargaron 10 µl de producto de PCR en un gel al 1% de agarosa y fueron sometidos a electroforesis a 85 Voltios durante una hora, se utilizó un buffer TBE 1X. El tanque de electroforesis que se utilizó fue un Electrophoretic Gel System EC 330, E-C MIDICELL PRIMO, E-C Aparatus Corporation. Holbrook, Newyork.

Los productos de PCR (bandas de ADN) se visualizaron mediante la tinción del gel en una solución de 1 µg/µl de bromuro de etidio, se observaron con un transluminador ultravioleta⁴ y fueron documentados electrónicamente a través del sistema KODAK BAS con un software dedicado a este propósito.

Cuadro 2. Perfil térmico de primers para Begomovirus, TYLCV y fitoplasmas.

Primers	CI	CICLOS	DES	HIBRID	EXT	EXT F.
PAL1v1978 PAR1c496	0	30	1 min., 94°C	1 min., 50°C	3 min., 72°C	3 min., 72°C
V61 C473	10 min., 94°C 10 s., 56°C 80 s., 72°C	30	50 s., 94°C	55 s., 56°C	80s., 72°C	0
R16F2n R16R2	2 min., 94°C	35	1 min., 94°C	2min., 55°C	3 min., 72°C	10 min., 72°C
rU3 fU5	0	35	30 s., 95°C	1.15 min., 55°C	1.5., 72°C	0

CI: Ciclo inicial. DES: Desnaturalización. HIBRID: Hibridización. EXT: Extensión. EXT F.: Extensión final. 0: No hay ciclo. min.: minutos. s.: Segundos

⁴ Transluminador ultravioleta (SPECTROLINE 120, Spectronics Corporation. Westbury, New York, USA.

Cuadro 3. Secuencias de Primers utilizados para detectar Begomovirus, TYLCV y fitoplasmas.

Patogeno	Región Amplificada	Primers	Secuencia	Referencia
Begomovirus	Top A region (1400 pb)	PAL1v1978	5' GCA TCT GCA GGC CCA CAT YGT CTT YCC NGT'3	Rojas <i>et al.</i> 1993
		PAR1c496	5' AAT ACT GCA GGG CTT YCT RTA CAT RGG 3'	
TYLCV	NP (410 pb)	V61	5' ATA CTT GGA CAC CTA ATG G 3'	Navot <i>et al.</i> 1991
		C473	5' AGT CAC GGG CCC TTA CAA 3'	
Fitoplasma	16S rRNA (1100 pb)	R16F2n	5' GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3'	Gundersen <i>et al.</i> 1996
		R16R2	5' TGA CGG GCG GTG TGT GTA CAA ACC CCG 3'	
Fitoplasma	16S rRNA (850 pb)	rU3	5' TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA 3'	Lorenz <i>et al.</i> 1995
		fU5	5' CGC CAA TGG AGG AAA CT 3'	

Y: Citosina, Timina .N: Adenina, Citosina, Guanina, Timina. R: Adenina, Guanina.
NP: No publicado.

II. Diagnóstico serológico (ELISA) para TMV, CMV y Potyvirus.

Se tomaron al azar 42 muestras de tomate y 28 muestras de chile para análisis por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). No se analizaron más muestras debido a la limitante en el número de pruebas de ELISA disponibles. A partir de cada muestra se pesó 0.15 g de tejido y se analizó para determinar la presencia de los virus TMV y CMV utilizando pruebas rápidas de tiras de ELISA de fluido lateral⁵ para TMV y CMV. Estas pruebas rápidas se pueden realizar en el campo, ya que no requieren de equipo de laboratorio y se pueden realizar en pocos minutos (Figura 1).

Para las pruebas de Potyvirus se seleccionaron 258 muestras (debido al número limitado de pruebas disponibles de ELISA indirecto⁶) y se siguió el protocolo según las especificaciones del fabricante.

⁵ Pruebas de ELISA de fluido lateral, Agdia Company ®. 30380 County Road 6, Elkhart, Indiana 46514 USA. 574-264-2014, Fax 574-264-215. www.agdia.com.

⁶ Pruebas de ELISA indirecta, Agdia Company ®. 30380 County Road 6, Elkhart, Indiana 46514 USA. 574-264-2014, Fax 574-264-215. www.agdia.com.

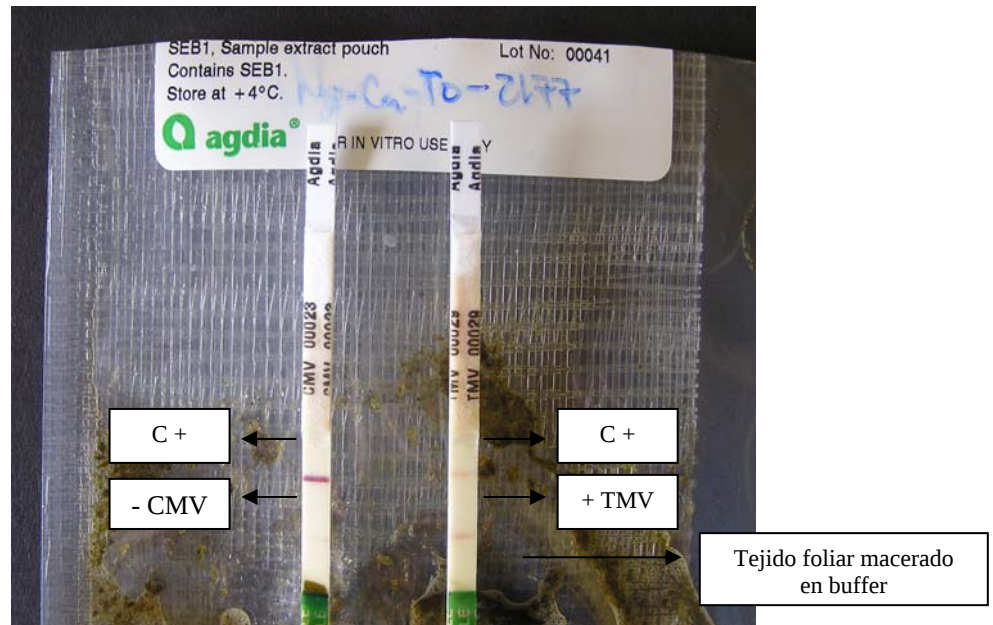


Figura 2. Prueba rápida de ELISA de fluido lateral mostrando resultados negativos para CMV y positivos para TMV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Infecciones virales causadas por Begomovirus. De las 299 muestras que fueron sometidas a pruebas de PCR para Begomovirus, solamente dos resultaron positivas, lo que representa menos del 0.01%. Las muestras identificadas como positivas son: 2SMMa2017 (2: Segundo viaje, SM: San Marcos de Colón, Ma: Maleza 2017: número de muestra analizada), y la 5ZaFr2086(5: Quinto viaje, Za: Zamorano, Fr: Fríjol y 2086: número de muestra analizada) (Figura 3).

La literatura reporta ampliamente la presencia del BGMV (Bean Golden Mosaic Virus) en fríjol en Honduras. Éste representa la especie tipo de los Begomovirus.

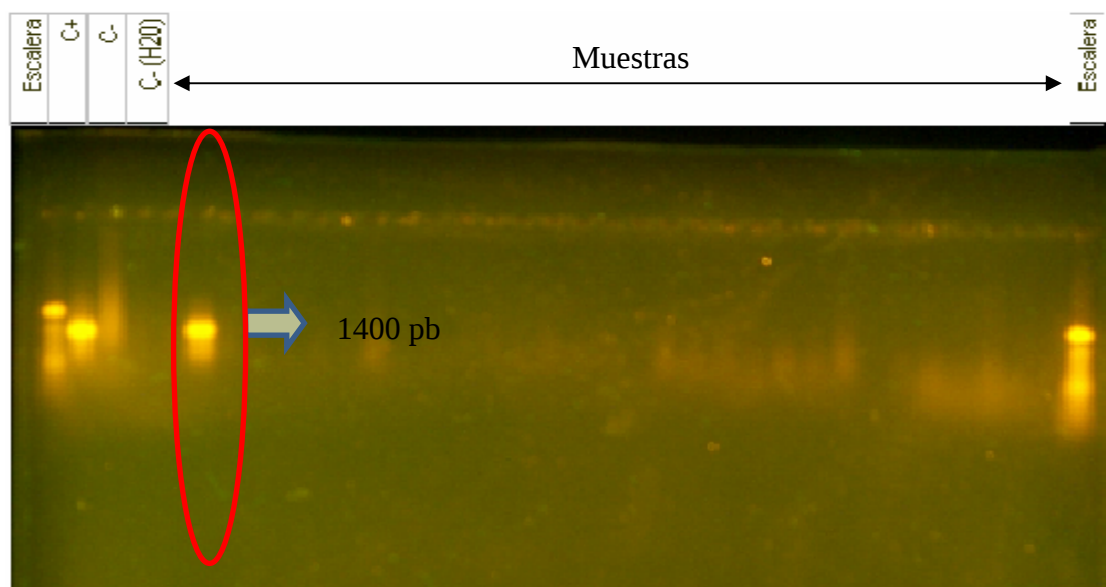


Figura 3. Gel de agarosa al 1% mostrando productos positivos con los primers PAL1v1978 y PAR1c496 (Rojas *et al.*1993) para la amplificación de Begomovirus, que amplifican un producto de 1400 pb. C+: Control positivo. C-: Control negativo. C- H₂O: Control negativo con agua.

Las dos muestras positivas a Begomovirus fueron amplificadas por PCR para TYLCV y ninguna resultó positiva (Figura 4). Sin embargo, Roca *et al.* (2006) reportaron la presencia de TYLCV en una muestra de maní forrajero procedente de Comayagua.

Por otro lado, 258 muestras fueron sometidas a pruebas de ELISA para Potyvirus (Figura 5). El 16% de las muestras resultaron positivas, las zonas con mayor porcentaje de infecciones fueron Ocotepeque y Santa Bárbara con 18 y 17%, respectivamente (Cuadro 4).

Las muestras positivas fueron de Cucurbitáceas en Ocotepeque, Comayagua, Lepaterique y Santa Bárbara, de tomate en Cantarranas y de algunas malezas en Santa Bárbara

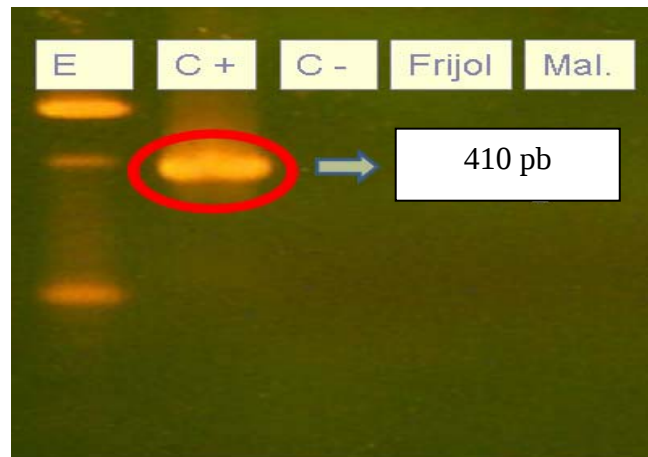


Figura 4. Gel de agarosa al 1% mostrando productos negativos con los primers V61 y C473 que producen una banda de 410 pb. C+: Control positivo. C-: Control negativo. Mal: Maleza *Euphorbiaceae*.



Figura 5. Placas de ELISA indirecta utilizadas en la detección de Potyvirus.

Incidencia de Begomovirus en Chile y tomate. De las 59 muestras de Chile analizadas, ninguna resultó positiva a Begomovirus (Cuadro 5). Otros estudios realizados en los últimos seis años muestran incidencias muy variadas de infecciones por Begomovirus. Guaman Cornejo (2000), Berneo Mármol (2001), Roca *et al.* (2006) y Roca *et al.* (2007) reportaron 88, 54, 21 y 29%, respectivamente en Chile (Cuadro 7).

Al igual que en Chile, todas las muestras de tomate (n=84) fueron negativas a Begomovirus (Cuadro 3). Berneo Mármol (2001), Toruño Calero (2005), Roca *et al.* (2006) y Roca *et al.* (2007) reportaron 23, 83, 69 y 45%, respectivamente de Begomovirus en tomate (Cuadro 7).

Incidencia de fitoplasmas en Chile y tomate. Ninguna de las muestras de Chile (n=59) resultó positiva para fitoplasmas (Cuadro 5). Hasta el momento no se habían

hecho estudios de incidencia de fitoplasmas en Chile en Honduras. Igualmente, en tomate ninguna de las muestras resultó positiva. Toruño Calero (2005) reportó resultados similares.

Cuadro 4. Porcentaje de muestras positivas a Potyvirus por zona de muestreo.

Localidad	Familia	n	Potyvirus		
			+	-	% +
El Paraíso		7	0	7	0
San Marcos de Colón		12	0	12	0
Ocotepeque	Cucurbitáceas	22	4	18	18
Copán		10	1	9	10
Zamorano		24	0	24	0
Comayagua	Cucurbitáceas	29	3	26	10
Lepaterique	Cucurbitáceas	21	3	18	14
Guinope		17	0	17	0
Cantarranas	Solanácea (Tomate)	29	1	28	3
Talanga		27	0	27	0
Yoro		36	0	36	0
Santa Barbara	Cucurbitáceas/Mal.	24	4	20	17
Total		258	16	242	6

n: Número de muestras. +: Número de muestras positivas. - : Número de muestras negativas. %+: Porcentaje de muestras positivas. Mal.: Malezas.

Cuadro 5. Muestras de Chile y tomate analizadas para Begomovirus y fitoplasmas.

Cultivo	n	% de muestras + por PCR	
		GV	Fito
Chile	59	0	0
Tomate	84	0	0

n: Número de muestras. GV: Begomovirus. Fito: Fitoplasmas. +: Positivo.

Incidencia de CMV en Chile y tomate. Ninguna muestra de Chile (n=20) resultó positiva a (CMV) (Cuadro 6). En otros estudios similares, Bermeo Mármol (2001), Roca *et al.* (2006), Roca *et al.* (2007) reportaron 8, 0 y 0%, respectivamente (Cuadro 7).

El 70% de las muestras de tomate fueron positivas a CMV (Cuadro 6). Bermeo Mármol (2001), Roca *et al.* (2006) y Roca *et al.* (2007) reportaron 0% (Cuadro 7).

Incidencia de TMV en Chile y tomate. El 10% de las muestras de Chile (n=20) fueron positivas para TMV (Cuadro 6). Bermeo Mármol (2001) reportó una incidencia de 0%. En tomate, la incidencia de TMV fue de un 90% (n=30) (Cuadro 6) muy similar a lo encontrado por Roca *et al.* (2006) quienes reportaron 100% (Cuadro 7).

Es significativo notar que el 70% de las muestras analizadas presentan infecciones mixtas a TMV y CMV. El TMV es transmitido mecánicamente, mientras que el CMV es transmitido por áfidos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Muestras de chile y tomate analizadas para TMV y CMV.

Cultivo	n	% de muestras + por ELISA		
		TMV	CMV	Otros virus
Chile	20	10	0	90
Tomate	30	90	70	10

n: Número de muestras. TMV: Virus del mosaico del Tabaco. CMV: Virus del mosaico del pepino.

Resumen de resultados. Desde el 2001, año en que se comenzaron a monitorear las pérdidas causadas por el complejo Begomovirus - mosca blanca, utilizando técnicas moleculares (PCR), se ha observado una marcada reducción en las muestras positivas (Figura 6 y Cuadro 7), mientras que la incidencia y severidad de los síntomas en el campo se han mantenido. Estos resultados sugieren que las infecciones virales actuales (2007) observadas en el campo no son causadas por el complejo Begomovirus - mosca blanca.

Cuadro 7. Cambio en la incidencia de infecciones virales del 2001 al 2007.

Cultivo	Época seca					Época de lluvia (2007)
	Guaman Cornejo (2000)	Bermeo Mármol (2001)	Toruño Calero (2005)	Roca <i>et al.</i> (2006)	Roca <i>et al.</i> (2007)	
CHILE						
Begomovirus	88	54	-	21	29	0
TMV	-	0	-	0	0	10
Potyvirus	-	0	-	0	5	0
CMV	-	8	-	0	0	0
TOMATE						
Begomovirus	-	23	83	69	45	0
TMV	-	-	-	100	-	90
Potyvirus	0	0	0	0	77	0.04
CMV	-	0	0	0	0	70

0: No hubo muestra positiva. -: No se hicieron pruebas.

La variabilidad encontrada en la incidencia de los agentes causales de infecciones virales, se puede atribuir a que éstas no son constantes en el tiempo, cambian año con año, según la época de siembra, etapa del cultivo, condiciones climáticas y prácticas

culturales. Por primera vez, desde el año 2000 se encontró una alta incidencia de CMV en tomate en infección mixta con TMV.

La mayoría de las muestras de chile resultaron negativas a todas las pruebas sometidas. Esto indica que los síntomas observados tienen una etiología aún desconocida y que los anticuerpos con que fueron desarrolladas las pruebas de ELISA no se complementan con los serotipos de nuestra región.

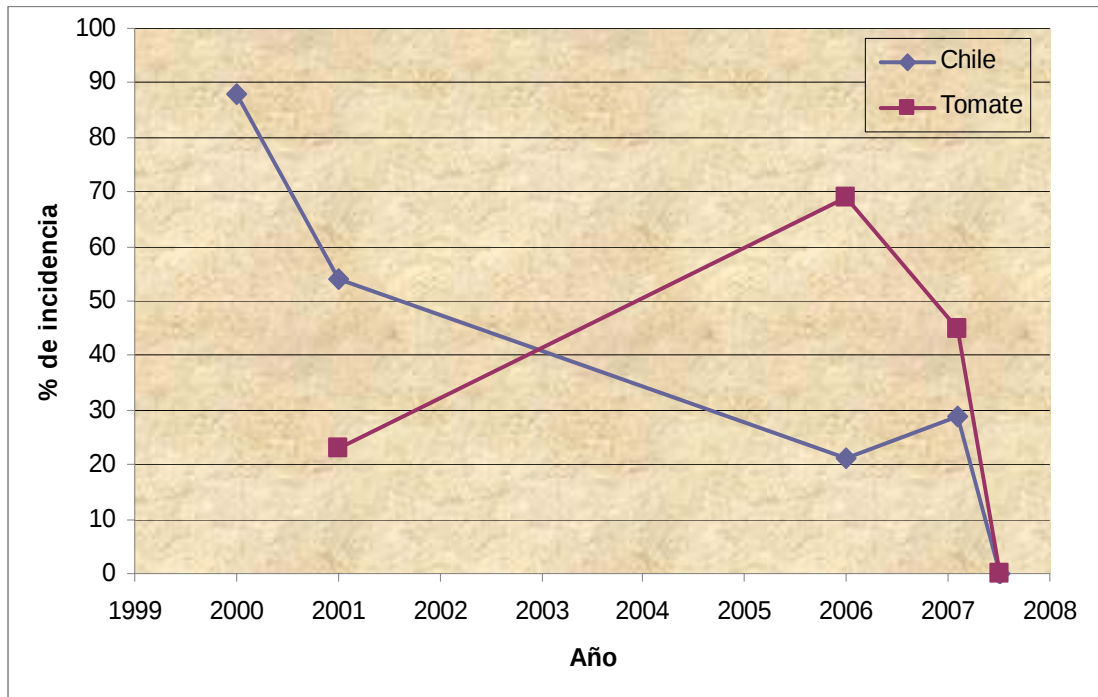


Figura 6. Cambio en la incidencia de Begomovirus en chile y tomate de 2001 al 2007.

CONCLUSIONES

- Los resultados confirman que ninguna de las infecciones virales observadas en el campo en los cultivos de chile y tomate, puede atribuirse a TYLCV o a algún tipo de fitoplasma.
- Los resultados sugieren que Honduras puede seguir siendo considerado como país libre de TYLCV.
- En el cultivo de chile 10% de las muestras sometidas a pruebas de TMV resultaron positivas. Se continúa sin saber la etiología de la enfermedad que está afectando el chile.
- En tomate, 20% de las muestras resultaron positivas a TMV, 70% a una combinación de TMV y CMV y del 10% restante, se desconoce la etiología. Esto permite concluir que en el cultivo del tomate se tiene una mejor información del tipo de agente infeccioso que esta causando la sintomatología virótica.
- Menos del 0.01% del total de muestras resultaron positivas para Begomovirus, por lo que no se puede seguir atribuyendo que los síntomas de virosis observados en el campo son causados por Begomovirus transmitidos por mosca blanca.
- El 16% de las muestras analizadas para potyvirus resultaron positivas. En su mayoría se encontró en plantas de ayote, pepino, sandía, y una de tomate. La incidencia de este tipo de virus y el CMV en tomate, sugiere una presencia importante de áfidos vectores de este tipo de virus.

RECOMENDACIONES

- Es necesario desarrollar pruebas de anticuerpos, con los serotipos de la región.
- Repetir el experimento, durante la época seca. Es necesario enfocarse en el cultivo del chile porque se desconoce que tipo de patógenos lo están afectando.
- No se recomienda usar agroquímicos contra fitoplasma y mosca blanca, debido a que ninguno es responsable de los síntomas de virosis observados en el campo.
- Es necesario enfocar los esfuerzos hacia complejos diferentes de Begomovirus - mosca blanca, sin dejar de monitorear el mismo.
- Hacer conciencia en los productores de la necesidad de las buenas prácticas agrícolas para el manejo del TMV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bermeo Mármol, E. 2001. Identificación de las principales infecciones virales en los cultivos de chile, tomate y sandía en Honduras. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 78 p.

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.

Brown, 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.

Caballero, R; Rueda, A. 1993. Las moscas blancas en Honduras. Las moscas blancas (Homóptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. Memoria del taller Centroamericano y del Caribe sobre moscas blancas (1992, CATIE, C.R.). Ed. Por Luko Hilje y Orlando Arboleda. CATIE, Turrialba, C.R. p. 50-53.

Gilbertson, R; Rojas, M; Russell, D; Maxwell, D. 1991. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. *J. General Virology* 72: 2843-2848.

Guaman Cornejo, J. L. 2000. Diagnóstico molecular y sexológico de enfermedades virales en chile y sandía en Honduras. Proyecto Especial del Programa Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras.

Gundersen, D. E; Lee, M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assay using two universal primer pairs. *Phytopath. Medit* 35: 114-151.

Lastres, L; Arguello, H; Rueda, A; Rivera, M. 2007. Guía para el reconocimiento y manejo de virosis en cultivos hortícolas. Programa de Manejo Integrado de Plagas en América Central (PROMIPAC– ZAMORANO–COSUDE). Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano, Honduras. 97 p.

Lorenz, K.-H; Schneider, B; Ahrens, U; Seemuller, E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non ribosomal DNA. *Phytopathology* 85:771-776.

Navot, N; Pichersky, E; Zeidan, M; Zamir, D; Czosnek, H. 1991. Tomato Yellow Leaf Curl Virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *J. of Virology* 185: 151-161.

Padidam, M; Beachy, R. N.; Fauquet, C. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. J. General Virology` 76: 249-263.

Polston, J.E; Anderson, P.K. 1994. Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por mosca blanca en el hemisferio occidental (en línea). Bogotá, CIAT. Manejo Integrado de Plagas no.53. Consultado 21 sept. 2007. Disponible en <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip53/art2-b.htm#Distribución>.

Roca, M.M.; 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. 27 p.

Roca, M.M.; Casco, D.; Flores, E.; Aguilar, E.; Valenzuela, J. 2007. Validación de prácticas para el manejo de mosca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Honduras. Informe CIAT 2006. Zamorano. 27 p.

Rojas, M.R; Gilbertson, R.L; Russel, D.R; Maxwell, D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Diseases 77: 340-347.

Toruño Calero, T. Y. 2005. Determinación de la presencia de geminivirus y fitoplasmas en tomate en Guatemala, El salvador, Honduras y Nicaragua. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 83 p.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN para geminivirus y fitoplasmas (Gilbertson *et al.* 1991).

1. Pesar 10 mg de tejido con síntomas de virosis.
2. Macerar con nitrógeno líquido. (Si se macera con el buffer de extracción agregar 620 µl y recuperar 510 µl del macerado).
3. Transferir el macerado a un tubo eppendorf .
4. Adicionar 90 µl de SDS 10%. Agitar con un vortex por dos minutos.
5. Incubar a 65°C por 10 minutos en un baño maría.
6. Agregar 150 µl de acetato de potasio 5M a pH 5.5.
7. Agitar con un vortex por dos minutos.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos. Recolectar 600 µl de sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
9. Agregar 600 µl de isopropanol al 100%.
10. Centrifugar a 14000 rpm a por 10 minutos.
11. Eliminar el sobrenadante por decantación.
12. Lavar el pellet con 600 µl de etanol al 70%.
13. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet invirtiendo el tubo eppendorf en un papel toalla durante 30 minutos.
14. Agregar de 50 a 100 µl de agua bidestilada estéril para resuspender el pellet.
15. Almacenar a 4°C.

Anexo 2. Protocolo para pruebas de ELISA de fluido lateral proporcionado por AGDIA.

1. Pesar 0.15 g de material con síntomas de virosis.
2. Colocar el tejido dentro de las bolsas con buffer que vienen en el kit
3. Macerar el tejido dentro de la bolsa, pasando fuertemente un pistilo sobre la bolsa hasta que el tejido este completamente desintegrado y el buffer tome el color del tejido.
4. Introducir las tiras dentro de la bolsa con tejido macerado.
5. Esperar 5 minutos y observar el resultado de la prueba.

Anexo 3. Protocolo para pruebas de ELISA indirecta con el marcador de la alcalina fosfatasa para la detección de Potyvirus proporcionado por AGDIA.

1. Preparación de la prueba

- Diluir los buffers concentrados proporcionados en el kit a su dilución de trabajo 1X con agua destilada. Preparar suficiente buffer para un día de trabajo.
- Preparar los controles liofilizados de acuerdo a las instrucciones del kit.
- Usando un marcador indeleble, enumerar las tiras en caso de que alguna tira se separe del marco.
- Doble una hoja de papel toalla e introdúzcalo dentro de una caja o cámara plástica sellada. Humedezca el papel, mantenga la placa en esta cámara húmeda durante los procesos para prevenir la incubación.

2. Diagrama de ubicación de muestras.

- Haga un diagrama de ubicación de las muestras y anote la localización de cada una de las muestras y anote su localización, incluyendo la de los controles.

3. Maceración y dilución de muestras.

- Seleccione el tejido infectado y remueva cualquier residuo de suelo de la misma ya que puede alterar los resultados.
- Macere el tejido en una relación peso del tejido y volumen de buffer de 1:100. Cuando haya extraído la savia de la planta, diluya la savia con buffer de extracción de muestra en una relación de 1:10 (v:v).
- Necesitará 100 µl de muestra preparada para cada celda y una cantidad extra para asegurar la capacidad de dispensar la muestra.

4. Colocación de las muestras.

- Coloque 100 μ l de la muestra preparada dentro de cada celda, agregue 100 μ l de control positivo a las primeras dos celdas y 100 μ l de buffer de extracción a la tercera y cuarta celda que sirven como controles negativos.

5. Incube la muestra en una cámara húmeda durante una hora.

6. Preparación del anticuerpo.

- Diez minutos antes de que termine la incubación, prepare el anticuerpo usando 1X ECI buffer y el vial del anticuerpo.
- Primero coloque 1X ECI buffer, luego adicione el anticuerpo de acuerdo a la dilución especificada en la tarjeta.
- El volumen de buffer 1X ECI requerido depende del número de celdas usadas para la prueba, requiriendo 100 μ l para cada celda. Para estimar el volumen necesario, preparar 1 ml para cada tira de 8 celdas usadas, o 10 ml para cada placa de 96 celdas.
- Se debe calcular el volumen de anticuerpo requerido basado en el volumen de buffer 1X ECI usado en las diluciones proporcionadas en la etiqueta. Use una punta estéril para cada frasco.
- Agregue el anticuerpo y mezcle bien.

7. Lavado de la placa.

- Al finalizar el tiempo de incubación de la placa lávela deteniendo los extremos de las tiras, en forma rápida decante el líquido en un recipiente o en el lavabo.
- Llene todas las celdas hasta rebalsar con PBST 1X, luego rápidamente decante la placa. Repita de 4 a 8 veces.
- Después de lavar, mantenga las tiras hacia abajo y golpee firmemente sobre una hoja de papel toalla para secar las celdas y eliminar el buffer. Asegúrese de no dejar burbujas o residuos de tejido vegetal dentro de las celdas.

8. Coloque 100 μ l del anticuerpo preparado en cada celda.

9. Coloque la placa dentro de una cámara húmeda e incube por dos horas a temperatura ambiente o por toda la noche a 4°C.

10. Preparación del conjugado-enzima.

- Diez minutos antes de que termine la incubación, prepare el conjugado-enzima usando 1X ECI buffer y el vial del conjugado-enzima.

- Primero coloque 1X ECI buffer, luego adicione el conjugado-enzima de acuerdo a la dilución especificada en la tarjeta.
- El volumen de buffer 1X ECI requerido depende del número de celdas usadas para la prueba, requiriendo 100 µl para cada celda. Para estimar el volumen necesario, preparar 1 ml para cada tira de 8 celdas usadas, o 10 ml para cada placa de 96 celdas.
- Se debe calcular el volumen de conjugado-enzima requerido basado en el volumen de buffer 1X ECI usado en las diluciones proporcionadas en la etiqueta. Use una punta estéril para cada frasco.
- Agregue el conjugado-enzima y mezcle bien.

11. Lave la placa de 4-8 veces con 1X PBST.

12. Agregue 100 µl del conjugado-enzima preparado a cada celda.

13. Incube la placa por una hora a temperatura ambiente.

14. Preparación de la solución PNP.

- Cada tableta PNP hará 5 ml de solución PNP a una concentración de 1 mg/ml, suficiente para una tira de 8 celdas.
- Prepare el buffer 15 minutos antes de terminar la incubación, mida 5 ml 1X buffer PNP a temperatura ambiente, por cada tableta a usar. Luego, sin tocar las tabletas adiciónelas al buffer. La luz y la contaminación puede repercutir en falsos positivos.

15. Lave la placa de 4-8 veces con 1X PBST.

16. Adicione 100 µl de solución PNP por cada celda.

17. Incubar la placa una hora en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

18. Evaluación de los resultados.

- Las celdas se pueden examinar de forma visual o en un lector de 405 nm.
- Las celdas con un desarrollo de color amarillento indican un resultado positivo.
- Las celdas que no muestran desarrollo de color, es decir, se ven transparentes son resultados positivos.

Anexo 4. Diagrama de ubicación de muestras en pruebas de ELISA indirecta.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
												A
												B
												C
												D
												E
												F
												G
												H

Anexo 5. Solución maestra (Master Mix) para las reacciones de PCR para Fitoplasma.

1. Solución madre para primers de fitoplasma (R16F2N/R16R2N).

Ingrediente	CM	CF	1 Rx (µl)	50 Rx
Buffer Taq Polimerasa	5X	1X	5	250
Cloruro de magnesio	25 mM	2 mM	2	100
DNTP'S	10 mM	0.2 mM	0,5	25
R16F2N (primer)	10 mM	0.2 mM	0,5	25
R16R2N (primer)	10 mM	0.2 mM	0,5	25
Taq Polimerasa	5U/µl	1 U	0,2	10
Agua			14,3	715
Total			23	1150
ADN			2	
Total/ tubo Eppendorf			25	

CM: Concentración de solución madre. CF: Concentración final. Rx: Reacción.

2. Solución madre para primers de fitoplasma (rU3/fU5)

Ingrediente	CM	CF	1 Rx (µl)	50 Rx
Buffer Taq Polimerasa	5X	1X	8	400
Cloruro de magnesio	25 mM	1.5 mM	2,4	120
DNTP'S	10 mM	0.1 mM	0,4	20
rU3 (primer)	10 mM	0.5 mM	2	100
fu5 (primer)	10 mM	0.5 mM	2	100
Taq Polimerasa	5 U/µl	0.2 U	0,04	2
Agua			20,16	1008
Total			35	1750
ADN			5	
Total/ tubo Eppendorf			40	

Cm: Concentración Inicial. CF: Concentración final. Rx: Reacción.

Anexo 6. Solución maestra (Master Mix) para las reacciones de PCR para Geminivirus.

1. Solución madre para primers de geminivirus (Pal1v 1978/Par1c 715)

Ingrediente	CI	CF	1 Rx (µl)	50 Rx
Buffer Taq Polimerasa	10X	1X	2,5	125
Cloruro de magnesio	25 mM	1.5 mM	1,5	75
DNTP'S	10 mM	0.2 mM	0,5	25
Pal1v 1978 (primer)	10 mM	0.2 mM	0,5	25
Par1c 715 (primer)	10 mM	0.2 mM	0,5	25
Taq Polimerasa	5 U/µl	1 U	0,2	10
Agua			18,3	915
Total			24	1200
ADN			1	
Total/ tubo Ependorf			25	

CI: Concentración Inicial. CF: Concentración final. Rx: Reacción.

Anexo 7. Distribución de zonas de muestreo y cultivos asociados.

Valles Muestrados	Zona	Maleza	Cultivo
El Paraiso	Araulí, Licana	<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.	<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.	<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	<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.	<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, Zona#3, Ensayos Dr. Rosas	<i>Galinsoga urticaefolia</i> , <i>Solanum americanum</i> , <i>Bidens pilosa</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> .

La muestras fueron conservadas en 80% de etanol y a 4°C en el laboratorio de Biología Molecular de la EAP Zamorano.

Anexo 8. Incidencia y severidad promedio de infecciones virales en chile en las zonas de muestreo.

Localidad	%Incidencia	Severidad
El Paraíso	50	M
San Marcos de Colón	70	M
Ocotepeque	40	M
Copán	40	L
Zamorano	50	M
Comayagua	70	M
Lepaterique	-	-
Guinope	30	L
Cantarranas	70	M
Talanga	40	L
Yoro	40	L
Santa Barbara	50	L

M: Moderado. L: Leve. -: No se tomaron datos.

Anexo 9. Incidencia y severidad promedio de infecciones virales en tomate de las zonas de muestreo.

Localidad	%Incidencia	Severidad
El Paraíso	40	L
San Marcos de Colón	30	M
Ocotepeque	70	L
Copán	50	L
Zamorano	40	M
Comayagua	70	M
Lepaterique	-	-
Guinope	20	L
Cantarranas	80	M
Talanga	60	M
Yoro	70	M
Santa Barbara	60	M

M: Moderado. L: Leve. -: No se tomaron datos.