

Zamorano
Carrera de Ciencia y Producción
Agropecuaria

BIBLIOTECA INSTITUTO TECNOLÓGICO
ESCUELA AGROPECUARIA PANAMERICANA
APARTADO 28
TAMUQUICALPA HONDURAS

Diagnóstico molecular y serológico de enfermedades virales en chile y sandía en Honduras

Proyecto Especial presentado como requisito parcial
para optar al título de Ingeniero Agrónomo
en el Grado Académico de Licenciatura.

Por:

Jose Luis Guamán Cornejo

MICROISIS:	_____
FECHA:	_____
ENCARGADO:	_____

Honduras: Abril, 2000

1094

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.



José Luis Guamán Cornejo

Zamorano, Honduras
Abril, 2000

DEDICATORIA

A Jaime, Susana, Diego, Carlos Andrés y mis dos enanas.

A María Luisa.

A mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por la inspiración.

A María Luisa por su eterno amor, apoyo y comprensión.

A Chalo por todo.

A Elsa, Karla, Estela y Lourdes por hacer un poquito menos difícil esta investigación.

Al equipo de Protección Vegetal: Antonio, Chimino, Yovanni, Caro y Doña María.

A Gabriel, Anrca y Bárbara por su colaboración como compañeros de laboratorio.

A los profesores de Protección Vegetal por sus enseñanzas y tiempo.

A mis amigos: Maricela L., Vanessa Q., Bárbara H., Andrea C., Rodrigo D., Héctor F., Juan Pablo F., Diego A., Elena G., Wicho V., Víctor Eloy C. y Carolina E. por hacer de este un lugar inolvidable.

A las familias Fiallos Salmerón y González Morazán por haberme abierto las puertas de su casa y su corazón.

A la LDU-Q por los triunfos.

A mis asesores por su dedicación.

Al Alma Mater.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A mis padres.

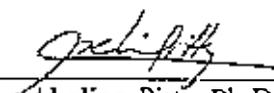
Agradezco al IPM-CRSP por brindarme el apoyo económico parcial para continuar mis estudios en el Programa Ingeniero Agrónomo.

RESUMEN

Guamán Cornejo, Jose Luis. 2000. Diagnóstico molecular y serológico de enfermedades virales en chile y sandía en Honduras. Proyecto Especial del Programa Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 63 p.

“Virosis” es un término mal utilizado para referirse a las enfermedades virales en las plantas cultivadas. Los cultivos de chile y sandía son altamente susceptibles a estos problemas fitosanitarios; su manejo ha sido poco efectivo debido a la falta de conocimiento de la etiología de las enfermedades virales y sus relaciones con vectores y hospederos. La percepción errónea es que la “virosis” constituye un solo problema relacionado a un vector, por lo general la mosca blanca. De esta manera, el manejo es principalmente el uso de insecticidas con sus repercusiones en la salud ambiental, pública y problemas de resistencia. La poca información que se tiene sobre estas enfermedades viene de diagnósticos visuales, que por lo general, son insuficientes en la identificación debido a la gran variedad de síntomas presentes. Se diagnosticaron visualmente y por métodos de laboratorio 50 muestras con diversos síntomas virales de cultivos de chile y 40 de cultivos de sandía (PCR para geminivirus y ELISA para potyvirus). El análisis visual y molecular mostró una alta incidencia (88%) de geminivirus en cultivos de chile, sin embargo, su relación ante las pruebas para potyvirus fue totalmente negativa (0%). Las muestras de cultivos de sandía mostraron moderadas incidencias de potyvirus (22.5%) y geminivirus (10%). En chile, la comparación del diagnóstico visual de geminivirus con el de laboratorio en chile, al parecer, fue más efectiva; sin embargo la técnica de PCR sólo detecta geminivirus mas no los identifica. En la sandía, la relación entre diagnóstico visual y de laboratorio fue muy baja, lo que sugiere una interacción del cultivo con mayor número de enfermedades de igual importancia. Ultimamente, el surgimiento de un nuevo biotipo de mosca blanca, biotipo B o *Bemisia argentifolii*, determina la necesidad de programas de manejo mucho más apropiados y agresivos para el complejo mosca blanca - geminivirus. Para esto, es necesario el conocimiento profundo del vector, la enfermedad y su relación.

Palabras claves : *Bemisia argentifolii* o Biotipo B, complejo mosca blanca - geminivirus, ELISA, PCR, potyvirus, virosis,


Abelino Pitty, Ph.D.

NOTA DE PRENSA

“VIROSIS” EN CHILE Y SANDÍA: MAS QUE UN PROBLEMA

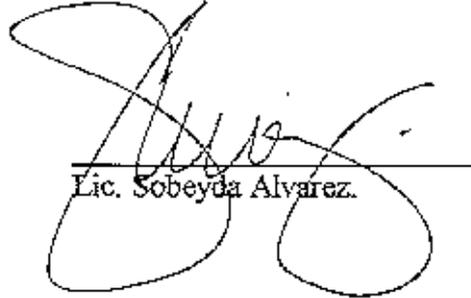
Es muy común escuchar a los productores de chile y sandía hablar sobre la virosis en sus cultivos ya que encuentra plantas pequeñas, descoloridas y arrugadas. Al hacerlo, generalizan una serie de problemas que pueden estar afectando a sus cultivos y sus bolsillos. La principal forma de manejo son las aplicaciones contra los insectos vectores con los consecuentes problemas de resistencia y daños a la salud pública y ambiental.

Se ha reportado que al chile y la sandía son cultivos altamente susceptibles a estas enfermedades; solamente el chile es susceptible a más de 90 tipos diferentes de virus a nivel mundial, que pueden presentar diversos síntomas y requieren diferentes formas de manejo. De esta manera, este diagnóstico visual de los cultivos llega a ser ineficiente e infectivo. Es fácil confundir los síntomas virales entre sí, y con otros problemas como deficiencias de nutrientes, excesos de plaguicidas, enfermedades, mutaciones, ataques de insectos chupadores, entre otros. Este problema se ha maximizado con el cambio en la eficiencia y agresividad de la mosca blanca en estos cultivos, que, como es sabido, es una de los vectores de virus, específicamente, los geminivirus.

En Zamorano, entre fines de 1999 y principios del 2000, se realizó un estudio que permitió evaluar qué tan fácil es diagnosticar un virus visualmente, enfatizando en los geminivirus que son los transmitidos por la mosca blanca. Se utilizaron compendios de enfermedades, que sería en este caso, una herramienta de diagnóstico al alcance de cualquier agricultor. Como patrón de comparación se tomaron los resultados de los análisis moleculares y serológicos del laboratorio de esa institución. Para esto, se recolectaron muestras de chile de los valles de Comayagua y Zamorano y de sandía de plantaciones de los departamentos de Valle y Lancho.

En las plantas de chiles se diagnosticaron visualmente más geminivirus que cualquier otro tipo de virus, esto fue respaldado con los resultados moleculares pues cerca de 90% de las muestras resultaron positivas. En sandía, el diagnóstico visual reportó principalmente síntomas de otros grupos como los potyvirus y los cucumovirus. Por el contrario, los análisis moleculares y serológicos encontraron incidencias moderadas de geminivirus (10%) y potyvirus (20%) Sin embargo, en el caso de los geminivirus, los análisis de laboratorio sólo permiten la detección de estas enfermedades y no la identificación como en el caso de los compendios. Para esto se enviaron muestras a la Universidad de Arizona para su identificación, así, esta sería el primer estudio que reportaría las enfermedades virales producidas por este tipo de virus en los cultivos de chile y sandía de Honduras.

Zamorano está comprometido a colaborar con los productores de estos dos cultivos, brindando información sobre estas enfermedades poco conocidas. Sin embargo, para lograrlo, es necesaria la participación conjunta de los productores, los investigadores y el gobierno.



Lic. Sobeyda Alvarez.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Páginas de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimiento	v
Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Nota de prensa.....	viii
Contenido.....	x
Indice de cuadros.....	xiii
Indice de figuras.....	xv
Indice de anexos.....	xvi
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 JUSTIFICACION DEL PROBLEMA.....	1
1.2 OBJETIVOS.....	2
1.2.1 Objetivos generales.....	2
1.2.2 Objetivos específicos.....	2
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1 CHILE.....	3
2.1.1 Taxonomía.....	3
2.1.2 Origen.....	3
2.1.3 Botánica.....	3
2.1.4 Importancia económica.....	3
2.1.5 Principales limitantes fitosanitarias.....	5
2.2 SANDÍA.....	9
2.2.1 Taxonomía.....	9
2.2.2 Origen.....	9
2.2.3 Botánica.....	9
2.2.4 Importancia económica.....	9
2.2.5 Principales limitantes fitosanitarias.....	10
2.3 ENFERMEDADES VIRALES.....	13
2.3.1 Generalidades.....	13
2.3.2 Síntomas.....	14
2.3.3 Transmisión de los virus.....	15
2.3.3.1 Transmisión por vectores.....	15
2.3.4 Chile.....	16
2.3.5 Sandía.....	18
2.4 COMPLEJO MOSCA BLANCA-GEMINIVIRUS.....	18

2.4.1	Importancia del problema.....	18
2.4.2	Situación en Honduras.....	20
2.5	MÉTODOS DE DETECCIÓN.....	21
2.5.1	Sintomatología visual.....	21
2.5.2	Inclusiones citoplasmáticas.....	21
2.5.3	Técnicas moleculares.....	22
2.5.3.1	PCR.....	22
2.5.3.2	Electroforesis.....	22
2.5.4	Pruebas serológicas.....	23
2.5.4.1	Ensayo de inmunoabsorbencia ligada a una enzima ELISA (“Enzyme linked immunosorbent assay”).....	23
2.5.4.2	“Dot immunobinding assay” (DIBA).....	23
2.6	ESTRATEGIAS DE MANEJO.....	24
3.	MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1	MUESTREO.....	25
3.1.1	Ubicación de los muestreos.....	25
3.1.2	Recolección de muestras.....	25
3.1.3	Identificación de muestras.....	25
3.1.4	Descripción de síntomas.....	26
3.1.5	Diagnóstico visual de infecciones virales.....	26
3.2	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO.....	26
3.2.1	Extracción y purificación del ADN total.....	26
3.2.2	Conservación de tejido foliar.....	26
3.2.3	Método de amplificación de ADN.....	27
3.2.4	Método de visualización del producto de PCR.....	27
3.2.5	Serología.....	28
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
4.1	CHILE.....	29
4.1.1	Sintomatología y diagnóstico visual.....	29
4.1.2	Resultados moleculares y serológicos para el diagnóstico de virus en el cultivo de chile.....	31
4.1.2.1	Resultados por técnica de PCR.....	31
4.1.2.2	Resultados por técnica de ELISA indirecta.....	32
4.1.3	Comparación del diagnóstico visual y molecular/serológico.....	32
4.2	SANDIA.....	34
4.2.1	Sintomatología y diagnóstico visual.....	34
4.2.2	Resultados moleculares y serológicos para el diagnóstico de virus en el cultivo de sandía.....	34
4.2.2.1	Resultados por técnica de PCR.....	34
4.2.2.2	Resultados por técnica de ELISA indirecta.....	36
4.2.3	Comparación del diagnóstico visual y molecular/serológico.....	36
4.3	PRUEBAS PRELIMINARES DEL METODO DIBA.....	37

5.	CONCLUSIONES.....	38
6.	RECOMENDACIONES.....	40
7.	BIBLIOGRAFIA.....	41
8.	ANEXOS.....	44

INDICE DE CUADROS

1.	Honduras. Superficie y producción de chile dulce en los departamentos más productores.....	4
2.	Principales limitantes fitosanitarias del cultivo de chile en 1986 en Honduras.....	6
3.	Principales enfermedades de chile ampliamente diseminadas en América Central.....	8
4.	Honduras. Superficie y producción de sandía en los departamentos más productores. 1993.....	10
5.	Principales desórdenes fitosanitarios en el cultivo de sandía en Honduras en 1986.....	11
6.	Plagas insectiles y vertebradas de sandía en Centroamérica.....	12
7.	Enfermedades foliares y del fruto, y nemátodos importantes del cultivo de sandía.....	12
8.	Enfermedades virales de cucúrbitas; virus identificados entre 1950 y 1970.....	13
9.	Principales enfermedades virales que afectan el chile y sus síntomas...	17
10.	Diagnóstico visual de enfermedades virales en las 45 muestras de plantas de chile que presentaron síntomas y su frecuencia.....	30
11.	Porcentaje de muestras de chile positivas a geminivirus y potyvirus por lugar de muestreo.....	31
12.	Relación del diagnóstico visual con los resultados de laboratorio en chile.....	32
13.	Muestras de chile procesadas para secuenciación y sus características	33
14.	Diagnóstico visual de enfermedades virales en las 35 muestras de planta de sandía que presentaron síntomas y su frecuencia.....	34
15.	Porcentaje de muestras de sandía positivas a geminivirus y potyvirus por lugar de muestreo.....	36
16.	Comparación del diagnóstico visual en muestras de sandía con los resultados moleculares y serológicos del laboratorio.....	36
17.	Muestras de sandía procesadas para secuenciación y sus características.....	37

INDICE DE FIGURAS

1.	Muestras de cultivos de chile, su diagnóstico visual y molecular.....	30
2.	Resultados de PCR para geminivirus en chile (primers: AV514/AC1048).....	31
3.	Muestras de sandía, su diagnóstico visual, molecular y serológico.....	35
4.	Resultados de PCR para geminivirus en sandía (primers: AV514/AC1048).....	35

INDICE DE ANEXOS

1.	Fluctuación de la población de mosca blanca en Zamorano.....	45
2.	Amplificación de ADN.....	46
3.	Extracción de ADN total (Planta y Viral), modificación de Doyle & Doyle (1990). FOCUS 12 (1): 13-15. Extracción Miniprep de ADN...	47
4.	Protocolo de la prueba de ELISA indirecta proporcionado por AGDIA.....	50
5.	Protocolo para la prueba DIBA.....	54
6.	Síntomas, diagnóstico visual, molecular y serológico de las muestras de chile y sandía.....	57

I. INTRODUCCION

I.1 JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

El chile y la sandía constituyen cultivos de alta importancia cultural y económica en Honduras. Estos generan fuentes de empleo, divisas y fuentes de nutrición. Ambos cultivos se encuentran seriamente amenazados por las enfermedades virales, y en especial, últimamente, por las generadas por el complejo mosca blanca - geminivirus.

"Virosis" es el término generalizado para denominar todas las enfermedades de carácter viral, que por lo general, relacionan a la mosca blanca como vector. De esta manera, se ha dado un uso indiscriminado de productos químicos que han sido ineficientes en el control de la denominada "virosis". Así, se hace necesario el diagnóstico de las enfermedades virales como primer paso al control de las mismas.

Ultimamente, las mayores investigaciones han recaído sobre un grupo de virus denominado geminivirus, aparentemente solo transmisible por mosca blanca. Además del poco conocimiento de este grupo de virus, la agresividad del vector los ha convertido en una de las limitantes principales de una serie de cultivos. Esto ha incentivado a los científicos a tratar de conocer más sobre esta relación y su entorno. De esta manera, surgen programas regionales como el IPM ("Integrated Pest Management") y el Bean Cow-Pea CRSP ("Collaborative Research Support Program") guiados por Zamorano, el CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación Agrícola), REDCAHOR (Red colaborativa de investigación y desarrollo de las hortalizas para América Central, Panamá y República Dominicana) entre otros.

El presente estudio inicia una larga investigación de identificación y caracterización de especies virales de chile (*Capsicum annuum*) y sandía (*Citrullus lunatus*) y sus posibles estrategias de manejo, con énfasis en el complejo mosca blanca - geminivirus. Posteriormente, se debe desarrollar estrategias de manejo, como el uso de variedades resistentes y tolerantes, así como la identificación de más enfermedades virales y sus vectores. Esta investigación se encuentra asociada con otras similares realizadas en la Universidad de Arizona en Tucson, la Universidad del Valle en Guatemala y la Universidad de Puerto Rico.

Por el alto número de especies de virus que infectan estos cultivos, la identificación y caracterización de las mismas se torna económicamente prohibitiva. De esta manera, se limita el número de muestras y análisis a realizar.

Cabe resaltar, que el área promedio de producción por agricultor es muy pequeña en ambos cultivos. Esto genera una limitante de logística por lo que en este estudio, se han seleccionado localidades caracterizadas por su alta capacidad de producir los cultivos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Identificar las principales enfermedades virales producidas por geminivirus, en los cultivos de chile y sandía y comparar su diagnóstico visual con el diagnóstico utilizando métodos de laboratorio.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar los geminivirus que infectan los cultivos de chile y sandía.
- Comparar el diagnóstico visual con los resultados de pruebas de identificación de laboratorio, mediante un registro fotográfico.
- Probar un sistema de conservación de muestras para serología.
- Colaborar con información obtenida para transmisión a productores y mejoradores.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CHILE

2.1.1 Taxonomía

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una planta de la familia Solanaceae, que incluye plantas comestibles domesticadas (tomate, papa), poco domesticadas (miltomate) o no domesticadas pero de usos tradicionales (hierbamora, vuélvete-foco) (CATIE, 1993).

2.1.2 Origen

Según el CATIE (1993), el origen del chile es atribuido al continente americano, principalmente a la parte sur de Brasil. Sin embargo, existen indicios de una domesticación del *C. annuum* en México. En la época precolombina, el cultivo se distribuyó al resto del continente y se estima que para los s. XV y XVI fue llevado a Europa, África y Asia por los colonizadores. Actualmente, se lo considera como un cultivo cosmopolita.

2.1.3 Botánica

Las especies cultivadas de chile se comportan como anuales en zonas de clima templado y como perennes de vida corta en el trópico. Es una planta semilicosa, monoica, dicotiledónea y autógama (Montes, ¿1992?).

2.1.4 Importancia Económica

En el mundo, el chile es la segunda solanacea vegetal en importancia después del tomate. El área plantada mundialmente se estima alrededor de 1.9 millones de hectáreas (Youn *et al.*, 1989). En América Central, el chile en todas sus especies es importante en la alimentación familiar. A nivel comercial, predominan las formas menos picantes, es decir, el chile dulce (CATIE, 1993). En Honduras, esta hortaliza tiene una importancia mayormente cultural. Económicamente no está considerado dentro de los principales cultivos hortícolas del país.

En Honduras el área de siembra de chile dulce excede las 500 hectáreas en la que participan 1200 fincas en los 18 departamentos, sin embargo, no ocupa un lugar importante entre las hortalizas principales sembradas en el país. El 54% de la producción se concentra en cuatro departamentos, tanto en valles a elevaciones entre 500 a 700 msnm, y en mesetas y laderas a 1 000 msnm. (Rodríguez Estrada, ¿ 1999 ?).

Cuadro 1. Honduras. Superficie y producción de chile dulce en los departamentos más productores. 1993*

Departamento	has cosechadas	Producción (t)
País	536	3,384
1. Comayagua	82	409
2. El Paraíso	55	779
3. Francisco Morazán	60	339
4. Yoro	20	293
Total	217	1,819
Porcentaje del país	40%	54%

has : hectáreas ; t : toneladas métricas.

* Se excluyen los municipios cuya producción no es significativa.

Fuente : Rodríguez Estrada, ¿1999?

El consumo del chile Jalapeño (*C. annuum* picante) a nivel local es bajo comparado al chile dulce. La producción de chile picante se destina al procesamiento industrial para su comercialización en el exterior como producto no tradicional, otorgando un alto valor agregado. Tal es el caso de compañías transnacionales que se dedican a la producción de este tipo de hortaliza como "Chesnut Hill Farms" y Cultivos Palmerola, Comayagua, Honduras, con áreas de producción superiores a las 300 hectáreas en conjunto.

Según el CATIE (1993), el sistema de cultivo que se practica en la región centroamericana es bastante tecnificado. Las inversiones son altas en insumos como : semilla, fertilizantes, plaguicidas y materiales diversos. Estas representan altos riesgos para los productores dadas las grandes fluctuaciones de los precios en el mercado, debido a las variaciones de oferta y al hecho de ser un producto perecedero.

El productor típico hondureño de chile dulce siembra áreas pequeñas. el censo de 1993 indica que la superficie promedio por finca es de solo 0.4 ha. Dada la continua demanda de estos productos, en las principales zonas productoras, los agricultores están escalonado las siembras de chile dulce ajustando su oferta a la magnitud y tendencia de la demanda (Rodríguez Estrada, ¿1999 ?). Esto trae como consecuencia un mal manejo de vectores y enfermedades virales, pues estas siempre encuentran un hospedero susceptible. De esta

manera. el triángulo de enfermedades que incluye un hospedero susceptible, un patógeno virulento y un ambiente favorable, siempre se completan a través del tiempo.

2.1.5 Principales limitantes fitosanitarias

Los productores de los trópicos tienen serios problemas de producción con chile (Yoon *et al.*, 1989). Los rendimientos dependen del nivel tecnológico utilizado por los productores, los factores climáticos y las plagas. Estos pueden ocasionar grandes pérdidas en la producción reduciendo la rentabilidad al productor (CATIE, 1993). Tal es el caso de la producción de chile en Asia tropical, en donde las principales enfermedades constituyen: complejos virales, *Phytophthora capsici*, antracnosis (*Colletotrichum* spp.), marchitez bacterial (*Pseudomonas solanacearum*) y moho del tallo (*Fusarium oxysporum*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*) (Yoon *et al.*, 1989).

En Centroamérica, el gasto en plaguicidas para el manejo de insectos y enfermedades en este cultivo, representa entre el 47 y 50% del costo total de insumos. Este rubro más los costos de aplicación, representan entre el 34 y el 47% de los costos totales directos de producción (excluyendo el costo de transporte). El manejo integrado de plagas (MIP) constituye una alternativa importante en mejorar el manejo de plagas reduciendo los costos para aumentar las rentabilidades y mejorando la capacidad para afrontar las fluctuaciones de los precios en el mercado (CATIE, 1993).

Moteiroso y Bustamante (1986), citan las plagas más importantes del género *Capsicum* como cultivo hortícola de clima templado a cálido, para el año 1986 en Honduras (Cuadro 2).

Cuadro 2. Principales limitantes fitosanitarias del cultivo de chile en 1986 en Honduras.

Nombre Común	Agente Causal	Nivel de Imp.*	Comentarios
HONGOS			
Mal del talluelo o Damping-off	Complejo de hongos :(<i>Fusarium oxysporium</i> , <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia solani</i>)	1	Mala preparación de semilleros es la causa
Marchitez	<i>Fusarium oxysporium</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Phytophthora capsici</i>	1 1 1	Este marchitamiento lo atribuyen en su mayoría a <i>Pseudomonas</i>
Manchas de la hoja	<i>Cercospora capsici</i>	2	
BACTERIAS			
Marchitamiento	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	1	Este es uno de los mayores problemas, pero confunden la sintomatología pudiendo estar presentes virus patógenos
Mancha del fruto	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	2	
VIRUS			
Muerte súbita	Virus del grabado del tabaco TEV	1	Detección en Olancho, en chile dulce (plántula) y tabasco (en producción). Posible confusión con marchitamiento bacterial. La característica de este problema en chile tabasco es que iniciada la floración se observa la planta sana, después de ciertos días aparece un marchitamiento seguido por muerte
Mosaico	Mosaico del Tabaco TMV	1	Identificado por sintomatología en Olancho; hojas pequeñas, corrugadas con color verde pálido y poco desarrollado en la planta. No hay muerte pero sí reducción de producción. Se observó relación con manejo de semillero y medidas usadas para trasplante de las plántulas del semillero al campo.

Nombre Común	Agente Causal	Nivel de Imp.*	Comentarios
NEMATODOS			
Nemátodos	<i>Helicotylenchus</i> sp. <i>Meloidogyne</i> spp. <i>Pratylenchus</i> sp. <i>Rotylenchus</i> sp. <i>Trichodorus</i> sp.		Es necesario realizar evaluación de daños, su importancia e identificación de estas plagas por región.
INSECTOS			
Picudo	<i>Anthonomus eugenii</i>	1	Se han iniciado trabajos para determinar niveles críticos.
Gusanos del finto	<i>Spodoptera</i> spp.	3	Es una plaga esporádica
Escarabajo	<i>Epitrix</i> sp.	3	Casi siempre están presentes pero el daño no se considera económico
Tortuguilla	<i>Diabrotica</i> sp.	3	
MALEZAS			
Caminadora	<i>R. cochinchinensis</i>	1	En Juticalpa es un problema; se ha transportado por maquinaria agrícola de regiones infestadas a nuevas áreas.
Coyolillo	<i>Cyperus rotundus</i>	1	
Flor amarilla	Varias especies	3	
Verdolaga	<i>Portulaco oleraceo</i>	3	
Bledo	<i>Amaranthus</i> spp.	3	
Mozote	<i>Cenchrus</i> spp. Otras especies	3	

- * Imp.: Importancia: 1: la plaga está presente en forma endémica o se presenta en forma esporádica, es generalizada en todas las áreas de siembra del cultivo, afectando los rendimientos e incrementando los costos de control. 2: La plaga es generalizada en las áreas de cultivo y cuando se presentan causan pérdidas, pero su control no es costoso ni problemático. 3: La plaga es generalizada en las áreas de cultivo, no causando pérdidas altas al productor, y su manejo se realiza al mínimo o no se realiza.

Fuente: Monterroso y Bustamante (1986)

Según Rodríguez Estrada (¿1999?), Siguatepeque ha sido la principal zona de producción de chile dulce, pero recientemente se ha reducido el área cultivada debido al ataque de mosca banca. Este es un cultivo delicado, muy susceptible al ataque de geminivirus, Marchitez Bacterial (*Pseudomonas* sp.) y Mancha Bacterial (*Xanthomonas* sp.). A partir de la década de los 80s, se ha observado un incremento en la problemática causada por el complejo mosca blanca-geminivirus. La globalización ha hecho que los países desarrollen ventajas competitivas especializándose en ciertos productos para maximizar sus ganancias. Sin embargo, esta tendencia ha llevado a cultivar grandes áreas de un solo cultivo, con las nefastas consecuencias que esto conlleva. En la actualidad, las enfermedades virales, fungosas y bacterianas del cultivo se encuentran ampliamente diseminadas en Centroamérica (Cuadro 3).

Además, el CATIE (1993) cita como las principales plagas insectiles del Chile en Centroamérica a: Picudo (*Anthonomus eugenii*), Mosca del Chile (*Neosilba* sp.), Tortuguilla (*Diabrotica* spp.), Áfidos (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii*), Gusanos del fruto (*Spodoptera* spp., *Estigmene acrea*, *Heliothis zea*, *Heliothis virescens*, *Manduca sexta*), Cortadores (*Agrotis ipsilon*, *Felitia subterranea*, *Spodoptera sunia*) y Mosca blanca (*Bemisia tabaci*); los ácaros: Araña roja (*Tetranychus urticae*), Acaro blanco (*Polyphagotarsonemus latus*). Señala, también, que los nemátodos más dañinos para el cultivo de Chile son: *Meloidogyne* spp., *Nacobbus uberrimus* y *Rotylenchus* sp. En cuanto a las malezas, se describe un alto número de especies entre las cuales considera importantes a *Melampodium perfoliatum* y *Emilia fosbergii*, por ser hospederos de la bacteria *Pseudomonas solanacearum*; y, *Cyperus rotundus*, por su agresividad producida por el intenso laboreo del suelo, el uso intensivo de herbicidas y el descuido de las prácticas de prevención y sanidad.

Cuadro 3. Principales enfermedades de Chile ampliamente diseminadas en América Central.

ENFERMEDAD Y AGENTE CAUSAL		
HONGO	VIRUS*	BACTERIA
Marchitez fungosa (<i>Phytophthora capsici</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>)	Virus del mosaico del tabaco (TMV) Tobamovirus	Marchitez bacteriana (<i>Pseudomonas solanacearum</i>)
Mal del tallo (<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Pythium</i> sp.)	Virus del grabado del tabaco (TEV) Potyvirus	Bolsa de agua (<i>Erwinia carotovora</i>)
Mancha Cercospora (<i>Cercospora capsici</i>)	Virus Y de la papa (PVY) Potyvirus	
Antracnosis (<i>Colletotrichum</i> spp.)		

*Hasta el momento representan factores limitantes en producción de Chile solamente en Comayagua, Honduras y en varias regiones de El Salvador.

Fuente: CATIE (1993).

En ambos estudios, se puede observar la diferencia de la importancia de las plagas a través del tiempo. Como causantes, se podría considerar algunas opciones entre las que constan: presión de selección por malas aplicaciones de agroquímicos, introducción por material infestado, resistencia, mutaciones, etc.

2.2 SANDÍA

2.2.1 Taxonomía

La sandía, *Citrullus lanatus* L., pertenece a la familia *Cucurbitaceae*.

2.2.2 Origen

La existencia de la sandía se remonta a la época prehistórica (Montes, ¿1992?). En un principio se adjudicó como lugar de origen al continente asiático. Posteriormente, se estableció su origen a África y de ahí se distribuyó a Asia, Europa y América. (Montes, ¿1992?)

2.2.3 Botánica

Es una planta herbácea, monoica, guiadora y anual. Posee un sistema radicular profundo, extendido lateralmente en los primeros 60 cm. Por su comportamiento floral, se considera una planta absolutamente andromonoica, polinizada por abejas y otros insectos. La parte comestible es el tejido de la placenta, comparado con el melón y zapallo en los cuales es el pericarpio (Montes, ¿1992?).

El cultivo requiere una estación prolongada de altas temperaturas y baja humedad; el promedio de temperatura favorable se encuentra entre los 20 y 25° C (Montes, ¿1992?).

2.2.4 Importancia económica

La sandía es el tercer producto hortícola más importante del país luego del melón y el tomate. En 1993, en el censo agrícola, ocupó el 10.6% de la superficie cultivada, el 15.5% de la producción en toneladas y el 17.8% de las divisas generadas por las hortalizas. Las principales zonas productoras del cultivo se encuentran en la región sur del país, en especial en los departamentos de Valle y Choluteca, en donde se estima que el área de producción es de cerca de 700 ha (Cuadro 4) y en esta intervienen los productores de melón. El producto se destina tanto al consumo doméstico como a la exportación. (Rodríguez Estrada, ¿1999?).

Cuadro 4. Honduras. Superficie y producción de sandía en los departamentos más productores. 1993

Departamento	Hectáreas Cosechadas	Producción (t)
País	2,549	64,716
1. Choluteca	823	24,801
2. Valle	374	5,472
3. Atlacatl	153	2,236
4. Comayagua	126	1,853
Total	1,476	34,362
Porcentaje del país	58%	53%

Fuente : Rodríguez Estrada, ¿1999?

El área de producción promedio por agricultor de sandía es de 2.1 ha, comparándolo con el melón que es de 71 ha y el de tomate, que oscila entre 0.7 y 1.4 ha. Existen alrededor de 1200 fincas que se dedican al cultivo de esta hortaliza, principalmente para el consumo interno (Rodríguez Estrada, ¿1999?).

2.2.5 Principales limitantes fitosanitarias

Existen más de 200 enfermedades de cucúrbitas reportadas de diversa etiología. Entre los principales desórdenes fitosanitarios se encuentran hongos, bacterias, fitoplasmas, virus y viroides, nemátodos, insectos y ácaros; sin menospreciar los daños causados por enfermedades no infecciosas como toxicidades, condiciones abióticas y desbalances nutricionales. (Zitter *et al.*, 1996).

En Honduras, la producción de sandía se ha visto limitada por la presencia de los agentes fitopatógenos citados anteriormente. En 1986, el MIP-CATIE/Honduras realizó un estudio en todas las áreas productoras del país y determinaron las principales limitantes fitosanitarias del cultivo de sandía (Cuadro 5).

Cuadro 5. Principales desórdenes fitosanitarios en el cultivo de sandía en Honduras en 1986.

Nombre común	Agente causal	Nivel de Imp.*	Comentarios
Hongos Cenicilla polvorosa	<i>Erisiphe chichoracearum</i>	2	El control químico de las enfermedades
Antracnosis	<i>Colletotrichum Lagenarium</i>	3	en cada uno de los cultivos, puede variar dependiendo del tipo de agricultor y del sistema de producción (consumo local y exportación).
Mildú o cenicilla vellosa	<i>Pseudopermaspora Cubensis</i>	2	
Virus Mosaico	Virus	1	Se desconoce cuál es el virus que presenta (VM ^b Pepino, VM calabaza VM sandía)
Insectos Gusano barrenador	<i>Diaphania spp.</i>	2	Esta plaga afecta hojas, tallos, flores y frutas. Se presenta en épocas secas.
Pulga saltona	<i>Epitrix cucumeris</i>	2	
Tortuguilla	<i>Diabrotica spp.</i>	2	
Mosca Blanca	<i>Bemisia tabaci</i>	2	
Afidos	<i>Aphis gossypii</i>	2	

* Imp.: Importancia; 1 : la plaga está presente en forma endémica o se presenta en forma esporádica, es generalizada en todas las áreas de siembra del cultivo, afectando los rendimientos e incrementando los costos de control. 2 : La plaga es generalizada en las áreas de cultivo y cuando se presentan causan pérdidas, pero su control no es costoso ni problemático. 3 : La plaga es generalizada en las áreas de cultivo, no causando pérdidas altas al productor, y su manejo se realiza al mínimo o no se realiza.

^b VM: virus del mosaico.

Fuente: Monterroso y Bustamante (1986)

En la actualidad, los problemas sanitarios que afectan a esta cucúrbita son mayores tanto en número como en importancia (Cuadros 6, 7 y 8). Además, la constante investigación ha permitido conocer mejor la biología y ecología de las plagas y, así, determinar prácticas de manejo que permitan reducir los problemas que generen. Los productores deben estar preparados para contrarrestar el ataque de diferentes factores de una manera amigable al ambiente y competitiva tanto en precios como en calidad.

Cuadro 6. Plagas insectiles y vertebradas de sandía en Centroamérica.

Especie	Orden : Familia	Importancia*	Tejidos afectados (etapa dañina)
<i>Phyllophaga</i> spp. y otros	Colcoptera : Scarabeidae	e	Raíces (larvas)
<i>Aeolus</i> sp. y otros	Coleoptera : Elateridae	e	Raíces (larvas)
<i>Bemisia tabaci</i>	Homoptera : Aleyrodidae	+++	Vector de virus (adulto), hojas (fumagina)(ninfas)
<i>Aphis gossypii</i> , <i>Myzus persicae</i>	Homoptera : Aphididae	+++	Vector de virus (adultos alados)
<i>Diaphania hyalinata</i>	Lepidoptera : Pyralidae	++	Flores, yemas, superficie del fruto (larvas)
<i>Diaphania nitidalis</i>	Lepidoptera : Pyralidae	+++	Fruto (larvas)
<i>Liriomyza</i>	Diptera : Agromyzidae	i	Hojas (larvas)
Ratas		e	Frutos

* +++ : plaga clave; ++ : plaga inducida; i : plaga inducida; e : plaga esporádica.

Fuente : Gladstone, 1999

Cuadro 7. Enfermedades foliares y del fruto, y nemátodos importantes del cultivo de sandía.

CLASE	NOMBRE COMÚN	AGENTE CAUSAL
Hongo	Mildió polvoriento	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>
Hongo	Mildió lanoso	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>
Hongo	Alternaria	<i>Alternaria cucumerina</i>
Hongo	Antracnosis	<i>Colletotrichum lagenarium</i>
Bacteria	Mancha angular	<i>Pseudomonas</i> spp.
Bacteria	Marchitez bacteriana	<i>Erwinia tracheiphila</i>
Nemátodos		<i>Meloidogyne incognita</i> <i>Rotylenchus reniformis</i>

Fuente : Gladstone, 1999

Gladstone, 1999), identificó los agentes causales de enfermedades de suelo en Guatemala y Honduras. Dentro de estos se mencionan : *Dydimella bryoniae*, muy común en los suelos de ambos países; *Rhizoctonia solani* y *Fusarium semitectum* en porcentajes de incidencia mayores al 50%; *Pythium* sp., hongo que está en el mayor porcentaje; y otros agentes entre los cuales cita a : *Monosporascus cannonbalus*, *Macrophomia phaseolina*, *Rhizopycnis vagum*, *Sclerotium rolfsii*, *Plectosporium tabacinum* y *Curvularia* sp. En la actualidad, los hongos de suelo constituyen una limitante para la producción de otra

cucurbita como es el melón, esto podría ser un problema para las sandía por ser un cultivo altamente susceptible a estos patógenos.

Cuadro 8. Enfermedades virales de cucurbitas : virus identificados entre 1950 y 1970

VECTOR	VIRUS
<i>A. gossypii</i> + <i>M. persicae</i>	WMV-2 Watermelon Mosaic Virus
<i>A. gossypii</i> + <i>M. persicae</i> + <i>Liriomyza</i> spp. (menor importancia)	PRSV Papaya Ringspot Virus (Watermelon mosaic)
<i>A. gossypii</i> + <i>M. persicae</i> + <i>B. tabaci</i>	CMV Cucumber Mosaic Virus
<i>Diabrotica</i> spp. + <i>Acalymma</i> spp.	SqMV Squash Mosaic Virus
<i>A. gossypii</i> + <i>M. persicae</i>	CTV Curl Top Virus

Fuente: Gladstone, 1999

Lastres (1991) determina que en la actualidad los virus no persistentes de las cucurbitas en Honduras son: el virus del mosaico de la sandía (WMV-1 y WMV-2), el virus del mosaico amarillo del zucchini (ZYMV), el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus del mosaico del zapallo (SqMV) y el papaya ringspot virus (PRSV) que se lo considera sinónimo del WMV-1. La misma autora (1992a.) cita un diagnóstico realizado en sandía y melón en diferentes zonas del sur de Honduras, en donde se encontró las mismas enfermedades virales citadas anteriormente y el virus del mosaico del frijol (BMV), en algunas muestras de melón. Además revela infecciones de geminivirus, sin señalar el nombre del virus específico.

2.3 ENFERMEDADES VIRALES

2.3.1 Generalidades

En 1886, Mayer estudió plantas de tabaco con "mosaico del tabaco". En sus investigaciones concluyó que, por el no desarrollo de hongos en las plantas inoculadas o en el jugo filtrado, el patógeno era una bacteria (Agrios, 1995). En 1892, Ivanowsky demostró que el patógeno podía pasar por filtros que retienen bacterias, concluyendo que la enfermedad era ocasionada por toxinas de algunas bacterias o por bacterias pequeñas que lograban pasar por los poros del filtro (Agrios, 1995). Beijerinck, 1898, llegó a la conclusión de que esta enfermedad no era causada por un microorganismo, sino por un *contagium vivum fluidum*, que denominó virus (Agrios, 1995).

Entre 1940 y 1950, el uso generalizado de la ultracentrífuga, el microscopio electrónico, la electroforesis y las técnicas serológicas, permiten conocer la estructura, composición

química, replicación y genética de los virus de las plantas (Agrios, 1995). Posteriormente, las pruebas serológicas, como el ensayo de inmunoabsorbencia ligada a una enzima (ELISA, sus siglas en inglés), y la producción de anticuerpos monoclonales permiten identificar los virus y de esta manera, desarrollar una taxonomía de los virus (Agrios, 1995).

En la actualidad, más de 700 enfermedades de plantas son causadas por virus, los cuales han sido asignados a 35 grupos de familias por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, (ICTV por sus siglas en inglés). Los virus son organismos submicroscópicos que se replican solamente dentro de células de huéspedes susceptibles. Varían en su configuración química (ARN o ADN), estructural, rango de hospederos y medios de dispersión. Estas características, además de la sintomatología y serología de los huéspedes, son comúnmente usadas para su detección, identificación y caracterización. Los virus son transmitidos por insectos, ácaros, hongos, nemátodos, medios mecánicos, injertos y semilla infectada (Zitter *et al.*, 1996).

En su forma simple, estos organismos constan de ácido nucleico y proteína, esta última forma una cubierta protectora llamada cápside en torno al primero. Aunque los virus pueden tener distintas formas, principalmente son de forma polihédrica o de varilla, o variantes de estas dos estructuras básicas. Algunos de los virus más grandes pueden tener varias proteínas diferentes, quizá con una función diferente cada una (Agrios, 1995).

2.3.2 Síntomas

El desarrollo de síntomas es el criterio usado normalmente para determinar una transmisión viral exitosa. Diferentes síntomas pueden servir para diferenciar, en muchos casos, entre virus y sus cepas. Es importante comprender que dos virus pueden inducir síntomas similares en una especie de hospedero y muy diferentes síntomas en otras especies. Incluso, los factores ambientales y el desarrollo fisiológico del cultivo, pueden afectar marcadamente los síntomas. (Gergerich, s.f.)

El tiempo que transcurre desde la inoculación del virus hasta la aparición de los síntomas varía enormemente de un virus a otro. En ciertos casos los síntomas se desarrollan más rápidamente a temperaturas elevadas. La severidad de los síntomas está relacionada a la concentración del inóculo (Lastres, 1991) y con la resistencia que muestre el hospedero.

El síntoma más común es la reducción en la tasa de crecimiento de la planta, que produce varios grados de enanismo o achaparramiento de toda la planta. Al parecer casi todas las enfermedades virales ocasionan cierto grado de disminución en el rendimiento total y que el período de vida de las plantas infectadas se acorte. Estos efectos pueden ser severos y fáciles de observar o pueden ser muy poco significativos y pasar inadvertidos con facilidad (Agrios, 1995).

La mayor evidencia sintomatológica de plantas infectadas por virus son comúnmente las que aparecen sobre el follaje, aunque algunos virus pueden producir síntomas visibles sobre el tallo, frutos y raíces con o sin el desarrollo de síntomas foliares. En la mayoría de enfermedades virales de plantas que aparecen en el campo, el virus se encuentra distribuido en toda la planta, por eso se les ha denominado infección sistémica, al igual que a sus síntomas. Cuando el virus produce pequeñas lesiones, a menudo necróticas, solo a nivel de los puntos de enuda, se las conoce como lesiones locales. Algunos virus pueden infectar ciertos hospedantes sin el desarrollo de síntomas visibles en ellos. En este caso se tendría un virus latente en un portador asintomático (hospedante). Muchas plantas que comúnmente muestran síntomas al ser infectadas podrían no presentarlos de no encontrarse las condiciones ambientales adecuadas (como en el caso de altas o bajas temperaturas), llamándose síntomas enmascarados (Agrios, 1995).

2.3.3 Transmisión de los virus

Los virus fitopatógenos nunca o casi nunca abandonan espontáneamente a las plantas. Por esto, no son diseminados por el viento o el agua, e incluso cuando son transportados en la savia o restos de plantas, en general, no producen infecciones a menos que entren en contacto con los contenidos de una célula viva dañada (Agrios, 1995).

Existen varios métodos de transmisión de los virus. Aquellos como la propagación vegetativa y por semilla tienen mucha importancia por el hecho de pasar de una generación a otra, sin embargo, no son trascendentales en la infección de plantas enfermas a plantas sanas en una misma generación (Agrios, 1995). Últimamente, existe una marcada importancia hacia los vectores de tipo insectil, aún cuando existen enfermedades virales en las que la transmisión de tipo mecánico toma mayor importancia.

En el caso de los geminivirus, la única forma de transmisión conocida es por medio de la mosca blanca, *Bemisia tabaci*. Investigaciones actuales han determinado como vectores de este tipo de virus a dos especies del género *Bemisia*; el comúnmente conocido *B. tabaci*, y un nuevo biotipo más agresivo que se ha llamado *B. argentifolii* o Biotipo B. En América Central, luego de la tormenta tropical Mitch, la presencia de mosca blanca y otros vectores disminuyó enormemente (Anexo 1). Sin embargo, muchos productores siguieron teniendo problemas con geminivirus indicando dos posibles problemas: una alta eficiencia de transmisión del vector o un posible nuevo vector. Es necesario contar con nuevas investigaciones que determinen la problemática actual con los vectores y sus posibles soluciones.

2.3.3.1 Transmisión por vectores. Los vectores, hasta ahora conocidos, que transmiten virus son: insectos, ácaros, nemátodos y hongos. De estos, los primeros son los más comunes y económicamente importantes como transmisores. Sin embargo, son solo los miembros de unos pocos grupos de insectos que pueden infectar a las plantas. El orden Homoptera contiene la mayor cantidad de especies vectores y las más importantes.

Los insectos pueden transmitir toda clase de virus, bacterias, hongos, espiroplasmas, rickettsias, nemátodos, fitoplasmas y fitomonas. El desarrollo de epidemias es más importante a nivel de rickettsias, fitoplasmas y virus. Estas últimas, son el problema fitopatológico más serio en el trópico americano, después de las causadas por hongos. El áfido *Myzus persicae* ilustra el problema distribuyéndose mundialmente con un amplio rango de hospedantes. Este es capaz de transmitir más de 100 enfermedades a cerca de 30 familias de plantas (Andrews y Quezada, 1989). La mosca blanca, por su parte, es considerada polífaga, y por lo menos 506 especies de plantas de 74 familias de dicotiledóneas y monocotiledóneas han sido reportadas como hospederos. Por ejemplo, se tiene datos de 96 especies de la familia de las Fabáceas, 56 Compuestas, 35 Malváceas, 33 Solanáceas y 17 Cucurbitáceas (Brown y Bird, 1992).

En el ciclo de la enfermedad, los insectos tienen una destacada participación en la inoculación, penetración y reproducción del patógeno (Andrews y Quezada, 1989). Existen cuatro principales patosistemas que ilustran las principales relaciones entre el virus y el vector:

- **Transmisión no persistente**, donde el virus es adquirido durante rápidas succiones a la epidermis de la planta, siendo retenido por minutos u horas.
- **Transmisión semipersistente**, en las que el virus es adquirido e inoculado en largas succiones al floema, pudiendo ser retenido por horas o días.
- **Transmisión persistente y circulativa**, en que se adquiere e inocula el virus durante largas succiones del floema, se mantiene durante toda la vida del vector multiplicándose en su intestino y circulando en los tejidos a través de la hemolinfa, pero no es transmitida a su progenie.
- **Transmisión persistente y propagativa**, donde el virus se multiplica y circula de la misma manera que el anterior y se propaga transováicamente a la progenie.¹

2.3.4 Chile

El chile es un cultivo muy susceptible a las infecciones virales. Numerosas investigaciones han determinado hasta 99 especies que infectan a las plantas domesticadas del género *Capsicum* en 1997 (Edwardson y Christie, 1997). Green y Kim (1991), por otro lado, afirman que son 35 las especies que infectan al cultivo y que la mayoría de estos están distribuidos a nivel mundial, exceptuando unos pocos. Muchas de éstos causan considerables pérdidas en rendimiento y reducción en la calidad del fruto.

Los vectores insectiles son la vía principal de transmisión de virus de una planta a otra (Valverde, 1999). Más de la mitad de las enfermedades virales que atacan al chile, son transmitidas por áfidos. Otros virus se transmiten por nemátodos, thrips, saltahojas, mosca blanca, tortuguillas y hongos (Green y Kim, 1991). Se presume que estos insectos causan problemas serios en las áreas más secas, con sistemas bajo riego, y se dan

¹ Doyle, M. 2000. Patosistemas virus - vector. Honduras, Zamorano. (Comunicación personal).

indicaciones que podrían convertirse en plagas mayores en el continente centroamericano (CATTIE, 1993). Algunas de estas enfermedades son transmitidas por contacto y/o por el suelo en mecanismos aún desconocidos (Green y Kim, 1991).

Cuadro 9. Principales enfermedades virales que afectan el Chile y sus síntomas.

Enfermedad viral	Grupo de virus	Ena	Ar	M	Am	VI	Cl	Mo
Alfalfa mosaic (AMV)	Virus bacilliforme			X				
Chili veinal mottle (CVMV)	Potyvirus	X						X
Cucumber mosaic (CMV)	Cucumovirus	X		X			X	
Pepper mottle (PMV)	Potyvirus			X	X			X
Pepper severe mosaic (PSMV)	Potyvirus			X				
Pepper veinal mottle (PVMV)	Potyvirus					X	X	
Potato Y (PVY)	Potyvirus			X			X	
Tobacco etch (TEV)	Potyvirus	X		X	X	X		
Beet curly top (BCTV)	Geminivirus	X	X				X	
Bell pepper mottle (BPMV)	Tobamovirus	X		X		X	X	X
Pepper mild mottle (PMMV)	Tobamovirus	X	X	X				
Tobacco mosaic Tomato mosaic (TMV), (ToMV)	Tobamovirus	X		X			X	
Tomato spotted wilt (TSWV)	Tospovirus	X	X	X			X	X
Chilli leaf curl (CLCV)	Geminivirus	X	X				X	
Tigre disease	Complejo de geminivirus	X	X		X		X	
Serrano golden mosaic (SGMV)	Geminivirus			X				
Texas pepper geminivirus	Geminivirus		X				X	

Ena: enanismo; Ar: arrugamiento; M: mosaico; Am: ampollamiento; VI: venas irregulares; Cl: clorosis; Mo: moteado.

Fuente : Black et al., 1993

Las enfermedades virales que infectan al cultivo del Chile presentan una amplia gama de síntomas, siendo los más comunes el mosaico, el moteado, la necrosis y las deformaciones foliares (Cuadro 9). Hojas, tallos, flores y frutos pueden ser afectados (Green y Kim, 1991).

2.3.5 Sandía

Zitter *et al.* (1996) determinan que entre las enfermedades que afectan las cucúrbitas, las causadas por virus son difíciles de controlar y pueden ser muy destructivas. Su incidencia y severidad pueden variar, dependiendo de las complejas relaciones con patógenos, hospederos, vectores, el ambiente y la localidad en la que ocurren.

Se han reportado un gran número de enfermedades virales infectando cucúrbitas, siendo la mayoría de éstas, económicamente importante; tal es el caso del "zucchini yellow mosaic virus" (ZYMV), una de las enfermedades más destructivas que afecta esta familia y que ha sido identificada en 22 países de cinco continentes. Muchos de estos pueden infectar especies de diversos géneros y familias y solo pocos son restringidos a cucúrbitas (Zitter *et al.*, 1996).

En Honduras se dispone de muy poca información sobre los virus que atacan las cucúrbitas y los áfidos que los transmiten. Además, es necesario conocer patrones de diseminación y factores abióticos y culturales que podrían favorecer su presencia (Espinoza, 1991).

2.4 COMPLEJO MOSCA BLANCA-GEMINIVIRUS

2.4.1 Importancia del problema

Según Ramírez (1992), de las aproximadamente 1200 especies de mosca blanca en América Central y el Caribe, las 30 más importantes están agrupadas en 15 géneros. No obstante, en base a criterios como persistencia, densidad poblacional, ámbito de hospederos y distribución geográfica, las especies claves son: *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Las infestaciones de *Bemisia tabaci* han aumentado en severidad e importancia en sistemas agrícolas secos tropicales e irrigados en América desde 1981 (Brown, 1992). Entre 1980 y 1990, las latitudes cálidas de América y el Caribe, productoras de fibras y vegetales han experimentado altas infestaciones de *B. tabaci* y las pérdidas por enfermedad ahora asociadas al complejo mosca blanca-geminivirus (Brown y Bird, 1992)

Caballero (1992) observó a la mosca blanca, *B. tabaci* en zonas bajas y calientes, y *T. vaporariorum* en zonas altas y templadas, como las especies más importantes en muchos cultivos del mundo. Las consideró como plagas super dotadas por poseer las características como agresividad, potencial reproductivo, amplio rango de hospederos, entre otros. *B. tabaci* colonizando yuca solamente había sido encontrada en África, sin embargo, en 1990-1991, se encontró en este cultivo en Florida, Puerto Rico y República Dominicana. Tampoco era considerada plaga del tomate hasta 1991 cuando se convirtió en problema clave en Florida. Ante esta situación, determinó la necesidad de estar preparados para enfrentarse a biotipos o razas geográficas. Concluyó que los primeros años de la década de los 90's era el momento propicio para comenzar a atacar un

problema que lo prevenga, argumentando que el costo de prevención sería menor que el de solución.

Trialeurodes vaporariorum produce un daño directo mediante la extracción de savia provocando la caída del follaje y evitando la maduración de los frutos, así como, desarrollando el crecimiento de fumaginas que dificulta la fotosíntesis y deteriora los frutos. *B. tabaci*, además de los daños directos mencionados, puede transmitir geminivirus (Ramírez, 1992). La primera transmisión de un tipo de virus transmitido por *B. tabaci* fue demostrada al inicio de la década de los 30's con el virus del encrespamiento de la hoja del tabaco y con el virus del mosaico africano de la yuca en yuca (Brown y Bird, 1992). En Centroamérica, las densidades de esta especie alcanzaron niveles extremos iniciada la época de los 70's, estando asociada en 1961 con la transmisión del virus del enrollamiento de la hoja del algodón en El Salvador, 1964 en Honduras y 1965 en Guatemala y Nicaragua. Posteriormente, causó severos problemas en frijol, principalmente en El Salvador, siendo el vector del virus del mosaico dorado (Ramírez, 1992). Desde mediados de los 80's, *B. tabaci* se ha convertido en una plaga seria y vector de virus en algodón, cucúrbitas, lechuga, chile y tomate entre las regiones tropicales del mundo. Actualmente es considerado el vector más importante y común a nivel mundial, así como el único vector conocido de geminivirus en hortalizas (Brown y Bird, 1992). Cabe recalcar, que Black et al. (1993) citan a *Circulifer tenellus* y *C. opacipennis*, especies de saltahojas vectoras del geminivirus que causa el enchinamiento de la remolacha BCTV ("Beet curly top virus").

Las razones para el cambio de status de *B. tabaci* de una especie inocua a una plaga clave y transmisora de virus no han sido debidamente aclarados. Sin embargo, se considera que los cambios en las prácticas agrícolas locales y regionales, la expansión del monocultivo bajo irrigación de hortalizas y otros cultivos, la expansión de épocas de cultivo debido a las variedades mejoradas, la introducción y resistencia subsecuente de poblaciones del insecto a nuevos plaguicidas y el incremento del transporte mundial de plantas y productos vegetales, han contribuido con el problema (Brown, 1993).

La sistemática de este insecto ha sido un problema. La taxonomía de *B. tabaci* ha resultado difícil de reconciliar debido a la plasticidad de sus características morfológicas claves, que pueden variar para adaptarse a las características morfológicas de la planta hospedante (Brown, 1993).

La mosca blanca se alimenta del contenido del floema de una planta mediante un estilete, método eficiente de adquirir y transmitir geminivirus. La transmisión de geminivirus es persistente de tipo circulativa. Para una infección adecuada se necesita un período de alimentación (adquisición) sobre la planta de 2 a 24 horas, seguido de un lapso de 2 ó 3 días para una inoculación óptima. Normalmente, la transmisión ocurre solo después de un período latente de 4 a 10 horas, pudiendo un individuo transmitir geminivirus por 5 a 20 días con una pérdida gradual en la eficiencia de transmisión con el tiempo. Es importante conocer que, bajo condiciones favorables, se pueden completar de 11 a 15 generaciones en un año y las hembras pueden depositar entre 100 y 300 huevos en un período de vida

de entre 3 y 6 semanas. Cuatro de los cinco instares de una mosca blanca son algo o completamente sésiles en el hospedero, por lo que el adulto es el vector importante (Brown y Bird, 1992).

Actualmente, la agricultura centroamericana está enfrentando una gran crisis que podría incrementarse mucho más con la aparición de un nuevo biotipo de *B. tabaci*, denominado biotipo B o *B. argentifolii*, reportado hasta ahora en Guatemala, Belice, Nicaragua, República Dominicana, Cuba, Puerto Rico y otras islas antillanas (Ramírez, 1992). Además, Guerra (2000), sugiere la presencia de la enfermedad de las hojas amarillas en cuchara del tomate, TYLCV, en Honduras. Es conocido que la *B. argentifolii* es el único vector reportado de esta enfermedad por lo que es posible que este insecto se encuentre en el país, sin embargo, es necesario continuar las pruebas moleculares de esta enfermedad antes de dar un veredicto).

Este biotipo se caracteriza, comparándolo con el biotipo A, por poseer mayor fecundidad, completar su desarrollo en el cultivo de tomate y atacar un mayor número de cultivos incluyendo crucíferas, efricos y papaya (Ramírez, 1992). Además, tiene mayor facilidad de desarrollar resistencia, es más móvil, tiene un mayor rango de hospederos y es capaz de elevar sus poblaciones en un corto período de tiempo.

2.4.2 Situación en Honduras

La mosca blanca, especialmente *Bemisia tabaci*, ha estado presente en varios cultivos en Honduras desde hace mucho tiempo. Hasta finales de la década de los 80's, estas plagas fueron consideradas secundarias, aunque su control fue necesario en cultivos y épocas específicas. A partir de 1989, llegaron a ser plagas claves en varios cultivos en Honduras (Caballero y Rueda, 1992).

En el caso del tomate del valle de Comayagua, Hilje y Arboleda (1993) estimaron que la reducción de la producción por enfermedades virales transmitidas por *Bemisia tabaci* es mayor al 70% obteniéndose pérdidas por más de US\$ 4 millones. Normalmente, estas estimaciones se hacen basadas en la población de mosca blanca del lugar lo que sobre estimaría los datos. Ante estos problemas, la Secretaría de Recursos Naturales, tomando en cuenta recomendaciones de la FAO, estableció un plan de veda entre diciembre de 1991 y junio de 1992, período elegido por ser el de mayor proliferación de la plaga. De esta manera, se quería romper el ciclo de vida de la mosca induciendo la rotación de cultivos no atractivos para la misma. Sin embargo, algunos agricultores sembraron en esta época tanto por necesidad como por cultura. (Caballero y Rueda, 1992).

Las poblaciones de este insecto en los cultivos de melón y sandía han sido bajas hasta el presente en la zona sur del país. Uno de los principales problemas fitosanitarios de estos son las enfermedades virales. Como se mencionó anteriormente, estudios realizados entre 1990 y 1992 determinaron cuatro enfermedades virales claves, todas ellas del grupo de los Potyvirus, transmitidos principalmente por áfidos: virus del mosaico del pepino

("Cucumber mosaic virus", CMV), del mosaico de la sandía ("Watermelon mosaic virus" WMV - 1), del mosaico del zapallo ("Squash Mosaic virus", SqMV) y del mosaico amarillo del zucchini ("Zucchini yellow mosaic virus", ZYMV). Para 1989 y 1990, se estimaba que el 11% de las infecciones virales eran producidas por geminivirus. Aún existe incertidumbre sobre la proporción de estas enfermedades transmitidas por este vector (Hilje y Arboleda, 1992)

2.5 MÉTODOS DE DETECCIÓN

El diagnóstico de cualquier enfermedad es un componente clave para el desarrollo de un programa de manejo. Los métodos recientemente desarrollados de detección de proteínas y ácidos nucleicos también son usados en el diagnóstico de enfermedades virales y son prácticas que permiten a los investigadores detectarlas con mayor rapidez y precisión. (Valverde, 1999). La identificación exacta de los virus debe ser confirmada con pruebas serológicas, moleculares y secuenciación, y suplementadas con la caracterización microscópica de la partícula viral y pruebas a los vectores (Green y Kim, 1991).

Los métodos actuales de detección normalmente utilizados son : la sintomatología visual; las inclusiones citoplasmáticas; la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR "Polymerase Chain Reaction") en combinación con la Electroléresis; y, las pruebas serológicas/inmunológicas como ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay").

2.5.1 Sintomatología visual

El uso de la sintomatología como un medio de detección de enfermedades virales es poco confiable. Según Green y Kim (1991), la identificación de las enfermedades virales nunca debe basarse en los síntomas solamente, porque estos pueden variar con la raza del virus, la especie del hospedero, la edad del hospedero, condiciones ambientales y posibles infecciones múltiples. Inclusive, enfermedades virales diferentes pueden causar síntomas similares, al igual que los daños por insectos, en especial por thrips y ácaros.

2.5.2 Inclusiones citoplasmáticas

Las enfermedades virales, normalmente, atacan los componentes de las células de los organismos, por lo que es posible observar microscópicamente las "inclusiones citoplasmáticas" que forman. Sin embargo, la observación de estas no permite diferenciar claramente la especie de virus que lo provoca por la similitud de inclusiones que existen en la actualidad entre las diferentes especies virales. Además, es necesaria mucha experiencia para poder diferenciarlos.

2.5.3 Técnicas moleculares

2.5.3.1 PCR. Este método provee medios extremadamente sensitivos de amplificación de pequeñas cantidades de ácido desoxirribonucleico (ADN). El método fue desarrollado tras el descubrimiento de la enzima Taq ADN Polimerasa, una polimerasa de ADN que es usada por la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima permanece estable a las altas temperaturas necesarias para la amplificación, mientras otras polimerasas de ADN se desnaturalizan (Slis, 2000).

“Descrito para los genes como la imprenta de Gutenberg para la escritura, el PCR puede amplificar una secuencia descada de ADN de cualquier origen (viral, bacterial, vegetal o humano), cientos de millones de veces en cuestión de horas, un trabajo que hubiera requerido varios días con tecnología recombinante. El PCR es especialmente valioso porque la reacción es altamente específica, fácilmente automatizada y capaz de amplificar diminutas cantidades de muestra. Por estas razones, el PCR ha tenido, también, un gran impacto en medicina clínica, diagnóstico de desórdenes genéticos, ciencias forenses y biología evolucionista.” (Smith, 1999).

En el PCR se sigue una serie de pasos conocidos como fases. En un inicio, se prepara una mezcla que contiene el ADN a reproducir o ADN meta, los primers² complementarios a la región a ser amplificada, buffer conteniendo iones de magnesio y potasio, dideonucleótidos trifosfatos y la enzima Taq ADN polimerasa que se mantiene estable a altas temperaturas. El ADN a reproducir o ADN meta es calentado a 90 - 95° C por un minuto aproximadamente, para separar sus dos cadenas. Este paso se conoce como Fase de Desnucleación. Posteriormente, en la Fase de Ligamiento, la enzima cataliza a los primers, usando las cadenas simples de ADN como meta. El proceso, en esta fase, se mantiene a cierta temperatura, generalmente entre 52 y 58 °C. Finalmente, la Taq ADN Polimerasa sintetiza el ADN creando una copia de cada cadena. Esta fase es conocida como de Extensión y se llega a temperaturas de 72 - 75°C, en la que la enzima sintetiza más eficientemente el ADN (Anexo 2).³

El ciclo se repite varias veces en un termociclador, con las nuevas cadenas de ADN meta y las enzimas extendiendo los primers adheridos a las cadenas simples de ADN. La reacción en cadena resulta en la amplificación exponencial del ADN original donde el número de ciclos (n) determina cuantas copias de ADN son producidas. (Herington, 1997).

2.5.3.2 Electroforesis. Este término describe la migración de una partícula con una carga a través de un medio de dispersión o soporte, por la influencia de un campo eléctrico. Los métodos electroforéticos son muy versátiles, sirven principalmente para la separación de mezclas complejas, como criterio de pureza, conocer las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un preparado crudo, entre otras.

² Iniciadores, cebadores..

³ Los tiempos y condiciones varían según el protocolo utilizado.

Las moléculas orgánicas, como el ADN, poseen una carga negativa por los fosfatos que forman el esqueleto de la molécula; una mezcla de éste es colocada en una celda del gel de electroforesis (agarosa o poliacrilamida). Las moléculas más grandes tienen mayor dificultad en pasar, mientras que las más pequeñas se mueven fácilmente, creando una separación entre moléculas que crece a medida que aumenta el tiempo de prueba. Los marcadores del método son una mezcla de moléculas de ADN con peso molecular conocido. Estos marcadores de pesos moleculares son usados para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN de la muestra. (Hughes, 1999)

2.5.4 Pruebas serológicas

2.5.4.1 Ensayo de inmunoadsorción ligada a una enzima ELISA (“Enzyme linked immunosorbent assay”). La prueba de ELISA es una prueba inmunoenzimática que se basa en la reacción entre un anticuerpo que reconoce un antígeno específico y su posterior conjugación con una enzima. Esta unión es altamente específica y cuando la reacción ocurre puede ser visible. Esta prueba tiene varias variantes, que se usan de acuerdo al análisis deseado, sin embargo, las dos más importantes son el método indirecto y el Sándwich de doble anticuerpo (Castaño-Zapata *et al.*, 1993). En la actualidad, las pruebas serológicas permiten la detección de geminivirus pero no la identificación precisa de qué virus se trata pues estos están serológicamente muy relacionados y por la dificultad de obtener cápside proteica a partir de la planta infectada (Brown y Bird, 1992). En la actualidad, no se ha podido desarrollar anticuerpos específicos para las enfermedades causadas por geminivirus por ser poco inmunogénicos, con excepción del virus del mosaico dorado del frijol (“Bean golden mosaic virus”, BGMV). Ahora, el énfasis cae sobre el PCR y la hibridación para la identificación de geminivirus.

2.5.4.2 “Dot immunobinding assay” (DIBA). Esta técnica serológica utiliza el mismo fundamento de ELISA indirecto, sin embargo, se diferencia por ser un método rápido y de menor costo. Se utiliza una membrana de nitrocelulosa, en lugar de una placa de ELISA, en donde se realiza la prueba, esto representa un costo mucho menor. Las muestras en esta membrana, de ser específicas, se unen al anticuerpo correspondiente. Los que han logrado unirse, son detectados por un segundo anticuerpo conjugado, específico al primer anticuerpo, lo que se podría llamar un anti-anticuerpo. Por ejemplo, si el primer anticuerpo es obtenido de un conejo, el segundo anticuerpo es una gamaglobulina preparada al inyectar el primer anticuerpo del conejo (gamaglobulina del conejo) en un animal diferente como una cabra, gallina o ratón. La interpretación de los resultados se basa en un cambio de color por la acción de la enzima sobre el sustrato cromógeno ligado al segundo anticuerpo (Randles, 1998).

2.6 ESTRATEGIAS DE MANEJO

La falta de información básica de la epidemiología de las enfermedades virales es un problema principal en el desarrollo de programas de manejo de virus (Espinosa, 1991). La táctica común utilizada en los campos es el control de vectores la cual ha sido deficiente pues no se lo hace de manera global y se somete a presión a las poblaciones, adquiriendo resistencia. Este control es mucho más difícil tratándose de geminivirus, como se mencionó anteriormente, por la plasticidad del vector. Además, la diversidad de los geminivirus transmitidos por mosca blanca se ha comenzado a estudiar en detalle recientemente. No obstante, aún se desconoce la epidemiología de este grupo de virus, lo que presenta enormes problemas para el manejo de las enfermedades causadas por estos.

Hilje (1996), cita la importancia que ha tomado la investigación básica y en métodos de combate para el complejo mosca blanca-geminivirus; de esta manera se han desarrollado el Plan Nacional de Investigación y Acción sobre *Bemisia tabaci*, de los EE.UU., y el Plan de Acción para el Manejo de Moscas Blancas y Geminivirus en Latinoamérica y el Caribe.

El manejo de la mosca blanca ha tenido complicaciones muy serias debido a la plasticidad genética, el amplio rango de hospederos, la transmisión de geminivirus y las poblaciones desmesuradas que se generan dado a su potencial reproductivo. Por el momento, la tendencia es hacia el manejo integrado de plagas (MIP), con los principios de convivencia, prevención y sostenibilidad (Hilje, 1996).

En sí, se han presentado muchas estrategias basadas en todas las técnicas conocidas del MIP, sin tener mayores resultados. Como ejemplo, Lastres (1992b.), determina que al destruir las plantas hospederas de virus en los alrededores de los cultivos, es una alternativa para el control de virosis; sin embargo, al no tener otras alternativas, el virus se podría hospedar completamente en el cultivo. Sponagel y Funez (1994), citan las medidas de control mayormente utilizada en el país. Describen medidas culturales como la destrucción de rastrojos, la eliminación de plantas hospederas y otros; medidas mecánicas como siembra de barreras rompevientos, raleo de plantas sintomáticas, uso de trampas amarillas y otras; medidas biológicas como enemigos naturales; insecticidas no tóxicos, como Nim, aceites, jabones; y, las medidas químicas que no dejan de faltar en un cultivo.

Una de las prácticas más estudiadas en la actualidad es la resistencia genética. Esta es una alternativa viable si se la utiliza como una táctica más del MIP, caso contrario podría traer repercusiones mayores como desarrollo de resistencia, disminución en el reservorio genético de las plantas, entre otros. De esta manera, se torna una alternativa presente y, hasta cierto punto, efectiva para el manejo de enfermedades virales. En este caso se ha utilizado los métodos convencionales de fitomejoramiento y, últimamente, la biotecnología expresada en los cultivos transgénicos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MUESTREO

3.1.1 Ubicación de los muestreos

Para el presente estudio se recolectaron muestras de material infectado de chile y sandía de distintas regiones de Honduras. En el caso del chile, se prefirió hacerlo en el tipo picante (jalapeño), pues como se mencionó anteriormente, el área promedio de cultivo del chile dulce es de 0.4 ha. El chile jalapeño tiene una importancia mayor a nivel de procesamiento y exportación, concentrando la producción en empresas como "Chesnut Hill Farms" y Cultivos Palmerola. Por esta razón, se visitó dos fincas de "Chesnut Hill Farms" en el Valle de Comayagua, donde se realizó la recolección de muestras.

La sandía, a su vez, fue muestreada a nivel de pequeños agricultores en los departamentos de Valley Olancho durante enero del 2000.

3.1.2 Recolección de muestras

Para la toma de muestras, se utilizaron bolsas plásticas pequeñas. En los lugares de muestreo se identificaron plantas con sintomatología viral variada. Se seleccionó el tejido joven, succulento y sin ningún otro daño, para la posterior extracción de su ADN. El tejido era arrancado usando como guante la misma bolsa que iba a servir para su almacenamiento, de tal manera que la mano no entre en contacto con la planta, para evitar contaminación de savia entre plantas distintas. Las muestras se identificaron y guardaron en hieleras para su conservación hasta llegar al laboratorio en Zamorano.

3.1.3 Identificación de muestras

Para la identificación de muestras, se elaboró un sistema de codificación basado en el existente en el Laboratorio de Biología Molecular de Zamorano. En el caso del chile, se utilizaron tres letras que resumían el lugar, zona y cultivo recolectado. Estas eran seguidas por números dados, siguiendo el orden que se ha llevado en el laboratorio, en la recolección de muestras. Por ejemplo, la muestra CNC-190, significa :

C : Comayagua (Lugar de recolección)
 N : Norte (Zona)
 C : chile (cultivo o M en caso de ser maleza)
 190 : número de muestra

Para la sandía, la codificación consistió de dos letras por el departamento y cultivo, seguido por el número de la muestra, de tal manera que la muestra VS-257, significa :

V : Valle (Lugar de recolección)
 S : sandía (cultivo)
 257 : número de muestra.

3.1.4 Descripción de síntomas

Se realizó una descripción de síntomas a cada muestra recolectada, basándose en la nomenclatura usada en la región. Las características comúnmente utilizadas fueron mosaico, corrugamiento, achaparramiento, clorosis o amarillamiento y encrespamiento.

Los síntomas presentes en el tejido foliar de las plantas fueron fotografiados para la creación de un archivo y base de datos.

3.1.5 Diagnóstico visual de infecciones virales

Una vez recolectada la información de síntomas, se diagnosticó la posible enfermedad viral presente, utilizando manuales de identificación de enfermedades virales : Black *et al.*, 1993; Zitter *et al.*, 1996; Blancard *et al.*, 1991.

3.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

3.2.1 Extracción y purificación del ADN total

Se utilizó el protocolo de Doyle & Doyle, FOCUS 12(1) :13-15 (Anexo 3). Se usó tejido foliar joven y en buen estado para este proceso.

3.2.2 Conservación de tejido foliar

De cada muestra, las hojas que presentaron mayor sintomatología visual, fueron cortadas en tiras delgadas. Se utilizó una tijera que se esterilizaba bajo flanco para cada muestra de manera de evitar contaminación. Las tiras de tejido fueron envueltas en paños delicados de laboratorio, selladas con cinta adhesiva que contenía la codificación de la

muestra y almacenadas en bolsas plásticas conteniendo sílica secante. Se almacenaron a 4°C, renovando la sílica secante cada vez que fuera necesario.

3.2.3 Método de amplificación de ADN

Se utilizó la técnica molecular de PCR. Se usaron los primers AV514 (cadena viral) y AC1048 (cadena complementaria) para geminivirus proporcionados por la Universidad de Arizona en Tucson, desarrollados para aislar el centro del gen de la cápside proteica de geminivirus del subgrupo III (Begomoviridae) y amplificar un producto de PCR de un peso molecular de 576 pares de bases nitrogenadas (pb) (Wyatt y Brown, 1996). Además se utilizó perlas de PCR ("Amersham Pharmacia Biotech, Inc.", Piscataway, NJ, USA) conteniendo ~1.5 unidades de *Taq* ADN Polimerasa con 10 mM de Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada base nitrogenada y estabilizadores incluyendo albúmina de suero bovino (ASB). Se reconstituyeron con 24 µl de agua destilada esteril y 0.5 µl de cada primer para obtener un volumen final de 25 µl. Posteriormente, esta mezcla se dividió en dos partes, transfiriendo 12.5 µl de reacción a un nuevo tubo. De esta manera se realizaron dos pruebas a partir de una sola perla. A cada microtubo se adicionó 1.0 µl de la respectiva muestra de ADN. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Perkin Elmer 480[®] (Norwalk, CT, USA) por 30 ciclos con desnaturalización, ligamiento y extensión establecidas a las siguientes condiciones :

1. Fase de desnaturalización : 94°C por 1 minuto.
2. Fase de ligamiento : 58°C por 1 minuto
3. Fase de extensión : 72°C por 1 minuto

Inicialmente se realizó un ciclo de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, conocido como "Hot Start", y un ciclo de extensión prolongado a 72°C por 5 minutos para aumentar la eficiencia de la amplificación.

Los controles positivos para geminivirus usados fueron muestras de chile y sandía de Comayagua. Diez muestras de chile y cuatro de sandía fueron enviadas a la Universidad de Arizona en Tucson, para su secuenciación. El producto de PCR fue conservado a -15°C.

3.2.4 Método de visualización del producto de PCR

El ADN se analizó por electroforesis, utilizando geles de agarosa al 0.75% conteniendo bromuro de etidio (0.5 µg/ml). El equipo usado para este proceso en el laboratorio fue un tanque de electroforesis Hoefer HE 33[®] (San Francisco, CA, USA), una fuente de poder Bio-Rad 1000/500[®] (Richmond, CA, USA) y un transiluminador de rayos ultravioleta UVP[®] (Upland, CA, USA).

Estos geles fueron cargadas con 9 μ l por agujero. Se colocó el marcador de ADN que determina el peso de las bandas, un control positivo de una muestra del Valle de Comayagua positiva para geminivirus, un control negativo constituido por los buffers sin ADN de ninguna muestra y en los agujeros restantes se distribuyeron las muestras a probar. La gel se colocó en el tanque y se la sometió a 90 voltios por 30 minutos aproximadamente. Las geles resultantes fueron fotografiadas con una máquina Polaroid DS34[®] (U.K.)

3.2.5 Serología

Las muestras fueron sometidas a la técnica de ELISA indirecto, para identificación de potyvirus, utilizando "kits" de ELISA de la casa comercial AGDIA (Anexo 4). Los resultados fueron analizados visualmente y utilizando un lector Bio-Tek Instruments[®] EL311 (Winoosky, VT, US), equipado con un filtro de 405 nm.

En el caso del DIBA, se usaron membranas de nitrocelulosa las cuales se colocaron en platos petri para realizar las pruebas. Para esta, se utilizó el protocolo que cita Randles (1998) (Anexo 5). Este método no ha sido probado por lo que se realizaron pruebas preliminares de concentración de las muestras y anticuerpos para poder realizar estudios posteriores. De esta manera, se utilizó tres muestras de diferente sintomatología y se los expuso a dos anticuerpos diferentes (CMV, PVY). Las muestras fueron diluidas en buffer PBS, en concentraciones (volumen de savia: volumen de buffer) de: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256. Además se usó diluciones de los anticuerpos de: 1:500, 1:1000 y 1:2000.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 CHILE

4.1.1 Sintomatología y diagnóstico visual

En los cultivos de la compañía "Chesnut Hill Farms Co." se pudo apreciar alrededor de un 70% de incidencia de enfermedades virales con diferentes grados de severidad. A pesar de lo anterior, los rendimientos no se vieron afectados sugiriendo una posible tolerancia del híbrido Milla, utilizado en esos campos. Cabe recalcar que las poblaciones de mosca blanca estuvieron siempre por debajo del nivel crítico (una mosca por planta).⁴

Los cultivos de chile de Zamorano se encontraban bajo invernadero por lo que la incidencia de las enfermedades fue baja, aún cuando se recolectaron muestras con diversos síntomas presentes en pequeño número en el campo.

De las 50 muestras recolectadas en el cultivo de chile, el 90% correspondieron a muestras de plantas de chile que presentaron síntomas virales. El resto fueron tomadas de malezas y plantas asintomáticas. La descripción sintomatológica obtenida se comparó con la descrita en el manual de identificación de enfermedades virales de Black *et al.* (1993), presentándose las siguientes enfermedades: "Tiger disease", SGMV ("Scirano Golden Mosaic Virus"), "Texas pepper geminivirus", PVMP ("Pepper Veinal Mottle Virus"), PVY ("Potato Virus Y"), CMV ("Cucumber Mosaic Virus"), TEV ("Tobacco Etch Virus"), PMoV ("Pepper Mottle Virus") y TSWV ("Tomato Spotted Wilt Virus") (Cuadro 10)(Figura 1).

⁴Suazo, J. 1999. La producción de chile en las fincas de Chesnut Hill Farms, Honduras, Chesnut Hill Farms Co. (Comunicación personal).

Cuadro 10. Diagnóstico visual de enfermedades virales en las 45 muestras de plantas de Chile que presentaron síntomas y su frecuencia

Diagnóstico visual	%
"Tiger Disease"	48.9
SGMV	17.8
"Texas pepper geminivirus"	13.3
PVMP	4.4
PVY	4.4
CMV	2.2
TEV	2.2
PMoV	2.2
TSWV	2.2

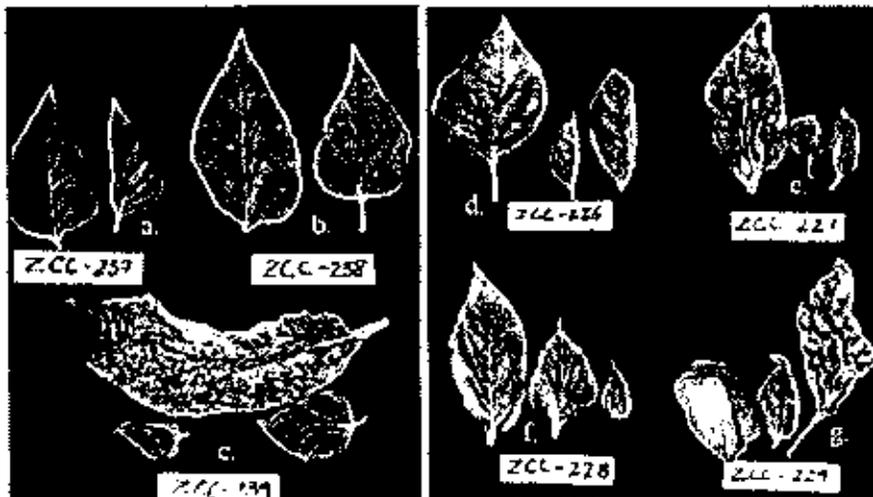


Figura 1. Muestras de cultivos de Chile, su diagnóstico visual y molecular. (a.) ZCC-237, planta asintomática, negativa para geminivirus. (b.) ZCC-238, PMoV, positiva a geminivirus. (c.) ZCC-239, TSWV, positivo para geminivirus. (d.) ZCC-226, Tiger disease, positivo a geminivirus. (e.) ZCC-227, Tiger disease, positivo a geminivirus. (f.) ZCC-228, PVY, negativo a geminivirus. (g.) ZCC-229, Tiger disease, positivo a geminivirus.

4.1.2 Resultados moleculares y serológicos para el diagnóstico de virus en el cultivo de chile

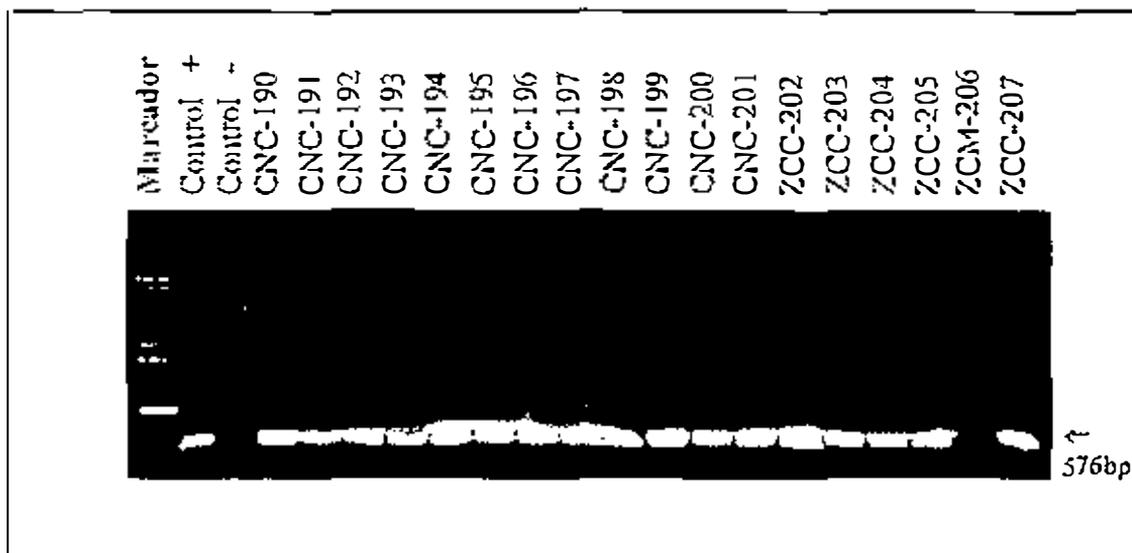
Luego de la extracción del ADN total (planta y patógeno) de las muestras de chile obtenidas en el Valle de Comayagua y Zamorano (Valle del Yeguaré), estas fueron analizadas mediante las técnicas moleculares utilizadas para la detección de geminivirus (PCR y electroforesis). Posteriormente se realizó la prueba de ELISA indirecta para Potyvirus.

Cuadro 11. Porcentaje de muestras de chile positivas a geminivirus y potyvirus por lugar de muestreo.

Lugar	# muestras recolectadas	Muestras positivas a geminivirus (%)	Muestras positivas a potyvirus (%)
Valle de Comayagua	28	93.0	0.0
Zamorano	22	82.0	0.0
Total	50	88.0	0.0

4.1.2.1 Resultados por técnica de PCR. Como se aprecia en el cuadro 11, los porcentajes de detección en el caso del chile son muy altos (Figura 2.), por lo que se podría concluir que el problema del complejo mosca blanca-geminivirus es muy importante en este cultivo. Sin embargo, las poblaciones de mosca blanca estuvieron siempre por debajo del nivel crítico. En este caso podría tratarse un nivel crítico ineficiente para esta plaga como vector o la gran efectividad de la mosca blanca como vector. Este último, maximizado por la presencia de nuevos biotipos como el B o B. *argentifolii*, más agresivos, prolfico, volátil y que han evadido la mayoría de tácticas de manejo establecidas para el vector.

Figura 2. Resultados de PCR para geminivirus en chile (primers: AV514/AC1048).



4.1.2.2 Resultados por técnica de ELISA indirecta. En la prueba serológica de ELISA, los resultados fueron inicialmente análogos (Cuadro 11). Ninguna muestra de este cultivo fue positiva a este ensayo (Anexo 6). Este resultado es contrario a lo que se encuentra reportado en la literatura, en la que se cita a los potyvirus como un grupo muy importante de virus atacando al chile en Honduras y a nivel mundial. Además, no se encontró ninguna infección doble entre los dos grupos más importantes de virus que atacan al chile en Honduras. Es posible que los geminivirus del chile, particularmente el jalapeño, logren evitar infecciones de potyvirus, o simplemente, la información anterior basada en el diagnóstico visual es errónea. Se descarta la posibilidad de una falla en la prueba ya que los controles positivos reaccionaron adecuadamente, además, el mismo material fue usado posteriormente en las muestras de sándia en donde se encontró resultados positivos. Sin embargo, se presenta la posibilidad de algún posible mecanismo de resistencia en el híbrido Mitla de Petoseed, mayormente analizado en este estudio

4.1.3 Comparación del diagnóstico visual y molecular/serológico

Visualmente se diagnosticaron 38 muestras como posibles geminivirus, de las cuales el 97.4% fueron positivas por PCR para geminivirus (Cuadro 12). En este caso, el diagnóstico visual y molecular concordaron, sin embargo, se podría mal interpretar los resultados pues la técnica de PCR permite detectar la presencia de geminivirus pero no identificarlos. Sería necesario determinar si las enfermedades específicas diagnosticadas visualmente son iguales a las diagnosticadas molecularmente para tener resultados más certeros, mediante el uso de primers específicos y/o la secuenciación de los mismos.

Cuadro 12. Relación del diagnóstico visual con los resultados de laboratorio en Chile

Diagnóstico visual	# muestras	# muestras positivas geminivirus	# muestras positivas potyvirus
Geminivirus	38	37	0
Potyvirus	5	4	0
Otros	7	3	0
Total	50	44	0

Dentro del grupo de plantas recolectadas en los diversos lugares, se recogieron muestras de plantas de Chile asintomáticas. La muestra VET-CNC-217 no presentó síntomas virales pero fue positiva para geminivirus, pudiéndose tratar de síntomas enmascarados por la planta o una infección sistémica en grado muy leve que no manifieste síntomas aún (infección temprana).

En los cultivos de donde se tomaron las muestras, se recolectaron dos malezas. En ambos casos se trató de bledo (*Amaranthus hybridus*). La primera muestra (VET-ZCM-206) no presentaba síntomas pero se recolectó por estar junto a una planta de chile muy afectada por los síntomas (VET-ZCC-205), esta última positiva a geminivirus; sin embargo, la maleza resultó negativa a la prueba. De la misma manera, se recolectó la segunda muestra de *A. hybridus* (VET-CNC-234) en Zamorano por presentar síntomas como venas irregulares y ampollamiento, reaccionando negativamente a los primers para geminivirus. Es importante mencionar que las malezas constituyen un grupo difícil de analizar mediante estas pruebas pudiendo existir falsos negativos.

Las extracciones de ADN de 10 muestras (Cuadro 13) fueron enviadas por cuadruplicado, en etanol (70% de concentración), al laboratorio de virología de la Universidad de Arizona en Tucson, dirigido por la Dra. Judy K. Brown para su secuenciación. Estas muestras aún están siendo analizadas por lo que se espera tener la identificación de los tipos de geminivirus encontrados en un tiempo muy próximo. De esta manera, este estudio consituirá la primera caracterización de geminivirus de chile en Honduras.

Cuadro 13. Muestras de chile procesadas para secuenciación y sus características.

Código	Síntomas	PCR geminivirus
VET-CNC-190	Mosaico en vena central, arrugamiento hacia el haz, ampollamiento en hojas tiernas.	+
VET-CNC-192	Enanismo, mosaico, arrugamiento hacia el haz, ampollamiento, vena central irregular, frutos deformes.	+
VET-CNC-193	Mosaico, ampollamiento, venas irregulares.	+
VET-CNC-194	Mosaico uniforme, ampollamiento y arrugamiento.	+
VET-CNC-198	Enanismo, arrugamiento, brownamiento excesivo, vena irregular. Planta arrárica.	+
VET-CNC-199	Mosaico generalizado, hojas onduladas, arrugamiento hacia el haz.	+
VET-CNC-216	Enanismo, mosaico, entrenudos cortos, arrugamiento hacia el envés.	+
VET-CNC-218	Clorosis, mosaico, vena irregular, arrugamiento para el haz, enanismo, entrenudos cortos, brotamiento excesivo.	+
VET-CNC-222	Mosaico, enanismo, arrugamiento. Frutos sin defectos.	+
VET-CNC-224	Clorosis, enanismo, ampollamiento excesivo, venas irregulares, arrugamiento hacia arriba.	+

4.2 SANDIA

4.2.1 Sintomatología y diagnóstico visual

Como se mencionó anteriormente, los agricultores que siembran sandía lo hacen en áreas relativamente pequeñas sin mayor uso de insumos contrario al caso del melón, la cucurbitácea de mayor importancia en el país. La percepción que tiene el pequeño agricultor hacia la "virosis" es relacionarlo con la mosca blanca como vector. El manejo típico sigue siendo la aplicación de insecticidas para eliminar los vectores. De esta manera, es fácil apreciar cultivos libres de vectores pero con alta incidencia de enfermedades de tipo viral.

En este caso se recolectaron un total de 40 muestras de las cuales el 87.5% correspondieron a plantas de sandía con presencia de síntomas de enfermedades virales. Esta sintomatología fue comparada con la presentada en los manuales de identificación de enfermedades virales de Zitter *et al.* (1996) y, Blancard *et al.* (1991), encontrándose ZYMV ("Zucchini Yellow Mosaic Virus"), CMV ("Cucumber Mosaic Virus") y WMV-2 ("Watermelon Mosaic Virus 2") (Cuadro 14) (Figura 3). En ciertos casos, los síntomas presentes en las muestras eran mejor caracterizados por deficiencias o infecciones de otro tipo de patógenos. Como en el caso del chile, las muestras restantes correspondieron a maleza y plantas asintomáticas.

Cuadro 14. Diagnóstico visual de enfermedades virales en las 35 muestras de plantas de sandía que presentaron síntomas y su frecuencia

Diagnóstico visual	%
ZYMV	57.1
CMV	22.9
WMV-2	14.3

4.2.2 Resultados moleculares y serológicos para el diagnóstico de virus en el cultivo de sandía

4.2.2.1 Resultados por técnica de PCR. De las 40 muestras de cultivo de sandía, solamente cuatro fueron positivas para geminivirus (Figura 4). De éstas, tres fueron recolectadas en el Departamento de Valle y una en el Departamento de Bolnho (Cuadro 15.) Estos resultados no fueron relacionados con su diagnóstico visual para geminivirus pues no se dispone de información de sintomatología de geminivirus en este cultivo.

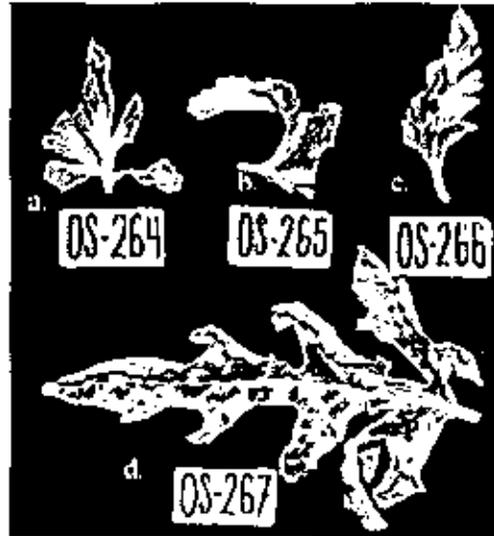


Figura 3. Muestras de sandía, su diagnóstico visual, molecular y serológico: (a.) OS-264, fitotoxicidad. (b.) OS-265, CMV. (c.) OS-266, ZYMV. (d.) OS-267, *Cladosporium cucumerinum* + ZYMV, positivo a potyvirus.

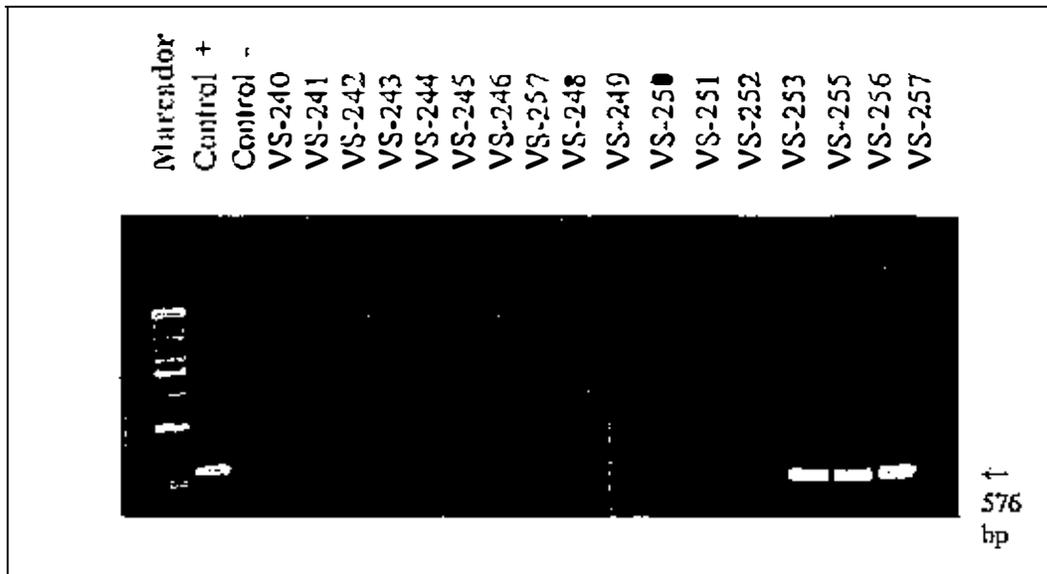


Figura 4. Resultados de PCR para geminivirus en sandía (primers: AV514/AC1048)

Cuadro 15. Porcentaje de muestras de sandía positivas a geminivirus y potyvirus por lugar de muestreo.

Lugar	# muestras recolectadas	# Muestras positivas a geminivirus	# Muestras positivas a potyvirus
Departamento de Valle	20	3	4
Departamento de Olancho	20	1	5
Total	40	4	9

4.2.2.2 Resultados por técnica de ELISA indirecta. En las pruebas serológicas, los resultados para potyvirus fueron diferentes a los del cultivo de Chile (Cuadro 15). Las 9 muestras serológicamente positivas a potyvirus fueron probadas de la misma manera, para PRSV ("Papaya Ringspot Virus") o WMV-1 ("Watermelon Mosaic Virus 1"), resultando todas negativas.

En el caso de las muestras del cultivo de sandía, la de código OS-268 reaccionó positivamente a ambas pruebas, pudiéndose tratar de una infección múltiple.

4.2.3 Comparación del diagnóstico visual y molecular/serológico

Visualmente, como posibles potyvirus se diagnosticó la mayoría de las muestras (63%), sin embargo, y como se muestra en el cuadro 16, solamente el 22.5% del total de muestras fue positivo serológicamente. Como se mencionó anteriormente, no se pudo diagnosticar visualmente geminivirus por falta de información.

Cuadro 16. Comparación del diagnóstico visual en muestras de sandía con los resultados moleculares y serológicos del laboratorio

Diagnóstico visual	# muestras	# muestras positivas geminivirus	# muestras positivas potyvirus
Potyvirus	25	2	8
Cucumovirus	8	2	1
Otros	7	0	0
Total	40	4	9

Cuatro muestras fueron enviadas por cuadruplicado en etanol (70% de concentración), al laboratorio de virología de la Universidad de Arizona en Tucson, dirigido por la Dra. Judy K. Brown para su secuenciación. Estas muestras aún están en proceso por lo que se espera tener la identificación de los tipos de geminivirus encontrados en un periodo de tiempo inmediato (Cuadro 17).

Cuadro 17. Muestras de sandía procesadas para secuenciación y sus características.

Código	Síntomas	PCR geminivirus
VS-253	Arrugamiento severo, clorosis, ampollamiento severo, enanismo	+
VS-255	Clorosis severa	+
VS-256	Enanismo severo	+
OS-268	Arrugamiento leve, enanismo, moteado, presencia de áfidos	+

4.3 PRUEBAS PRELIMINARES DEL METODO DIBA

Ninguna de las pruebas realizadas con este método dio resultados positivos. Es posible que el conjugado haya sido desactivado por haber sido almacenado, durante el tránsito, a -15°C, cuando se recomienda refrigerar a 4°C. Además, no se contó con muestras positivas como control que permitieran determinar el buen seguimiento del método.

Sería necesario obtener muestras positivas a los anticuerpos presentes en el laboratorio de Zamorano para determinar si la metodología usada es la correcta. Este laboratorio cuenta con los materiales e instrumentos necesarios para desarrollar esta prueba por lo que debería ser más tomada en cuenta por tratarse de un método de bajo costo, sencillo y rápido.

5. CONCLUSIONES

5.1 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO

Los resultados obtenidos indican que las enfermedades virales producidas por geminivirus en el cultivo del chile (*Capsicum annuum*) constituyen la problemática más común e importante en las dos zonas muestreadas, mientras que las otras infecciones virales son secundarias.

Por el contrario, en el caso de la sandía, los resultados sugieren que las enfermedades virales del grupo de los potyvirus son más limitantes que las del grupo de los geminivirus, en las dos zonas muestreadas. Con la baja incidencia demostrada, es probable que sean algunas las enfermedades virales de importancia que afectan este cultivo y de diferentes grupos, lo que dificultaría su manejo.

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

El conocimiento de la etiología de la enfermedad es un factor determinante para poder desarrollar programas de manejo. Hasta el momento se cuenta con poca información acerca de este tipo de enfermedades lo que ha limitado su entendimiento y, por ende, su manejo.

Los métodos visuales de diagnóstico e identificación no son herramientas efectivas y adecuadas en el caso de las enfermedades virales. Es necesario la ayuda de procedimientos moleculares para poder asegurar un buen manejo de las enfermedades; sin embargo, se tiene como limitantes el alto costo de los reactivos, equipo y personal especializado para su realización.

La errónea percepción de los agricultores hacia la relación de la "vírosis" con la mosca blanca ha determinado un mal manejo del problema. Son muchas las enfermedades virales que atacan estos dos cultivos y la mosca blanca no es su único vector. El control químico del vector, por lo general la única táctica de manejo, ha sido ineficiente en el control de este tipo de enfermedades y ha desarrollado otros problemas de resistencia, daños a la salud ambiental y pública, entre otros.

Las poblaciones de mosca blanca en 1999 y principios del año 2000 no alcanzaron los niveles críticos en las áreas de recolección. Sin embargo, se observó alta incidencia y severidad de geminivirus, principalmente en el cultivo del chile, demostrando la

efectividad de este insecto como vector o, posiblemente, un mal uso de niveles críticos. Esto torna ineficientes las tácticas de manejo utilizadas hasta el momento..

La erradicación de esta plaga en Honduras es una idea prácticamente imposible. Las tácticas de MIP no han funcionado, no necesariamente por su ineffectividad, sino por la actitud de los agricultores ante los problemas. Incluso se ha tratado, como método legal, establecer vedas de producción de cultivos susceptibles al ataque del vector, sin resultados pues los agricultores siguen sembrando estos cultivos.

6. RECOMENDACIONES

Es necesario darle seguimiento a estudios de este tipo para poder desarrollar programas de manejo de las enfermedades virales.

Se necesita un programa de apoyo de los productores, investigadores y gobierno para poder continuar con este tipo de estudio por su alto costo y dificultad en logística.

Se deberían realizar ensayos de variedades con germoplasma resistente o tolerante a geminivirus para poder tener soluciones a corto plazo, dado que es un problema que en un futuro cercano puede comprometer seriamente la producción y tener importantes repercusiones socio económicas.

Se deben investigar las posibles relaciones de los geminivirus con otros tipos de vectores, pues es conocido que en el caso del Chile, el vector de la enfermedad del BCTV ("Beet Curly Top Virus") es un geminivirus transmitido por un saltador de hojas y no por mosca blanca.

Posiblemente los niveles críticos con los que se está trabajando actualmente ya estén obsoletos. Podría evaluarse ensayos con diferentes niveles críticos ya que, en el caso del complejo geminivirus- mosca blanca, se trata de un vector muy agresivo y de una plasticidad genética enorme. Sin embargo, esto podría convertirse en un arma de doble filo pues, en sí, ya los niveles críticos son bajos y tampoco se quiere aplicaciones continuas de insecticidas.

Las muestras obtenidas en el campo deberían ser analizadas con pruebas de ELISA específicas para otros tipos de virus para descartar posibilidades de infecciones múltiples en el Chile y enfermedades recientemente ingresadas en la sandía.

Además, es necesario realizar un estudio de biotipos de *Bemisia tabaci* o nuevas especies del género, y así determinar la presencia de *B. argentifolii* o Biotipo B que podría alterar todas las prácticas de manejo sugeridas hasta el momento.

7. BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G.N. 1995. Fitopatología. Trad. por Manuel Guzmán Ortiz. 2 ed. México. D.F. Limusa. 838 p.

ANDREWS, K.L.; QUEZADA, J. . 1989. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura: estado actual y futuro. Zamorano, Honduras. DPV-EAP. p. 89-109.

BLACK, L.L.; GREEN, S.K; HARTMAN, G.L.; POULOS, J.M. 1993. Enfermedades del chile: Una guía de campo. Trad. por Benigno Villalón, José M. Amador y Mercedes Campos. Taipei, Taiwán. s. n. 98 p. (Asian Vegetable Research and Development Center publication no. 93-401)

BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. 1991. Maladies des cucurbitacées: Observer, identifier, lutter. Paris, Francia. INRA. 301 p.

BROWN, J.K. 1993. Evaluación sobre los biotipos de mosca blanca en América, de 1989 a 1992. In Las moscas blancas (Homoptera : Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. Trad. por Bernal Valverde. Ed. por Luko Hilje y Orlando Arboleda. Turrialba, Costa Rica. CATIE. p. 1-9. (Serie técnica. Informe técnico / CATIE; no. 205)

_____ ; BIRD, J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. Plant disease (USA). 76(3): 220 -224.

CABALLERO, R. 1992. Moscas blancas en cucúrbitas de Centroamérica : situación actual y consecuencias futuras. In IV taller centroamericano en fitoprotección del melón (1992, 27-28 Agosto, Managua, Nicaragua). Ed. por Lorena Lastres de Rueda. Zamorano, Honduras. DPV-EAP. p. 12. (Publicación DPV-EAP No. 483)

_____ ; RUEDA, A. 1992. Las moscas blancas en Honduras. In Las moscas blancas (Homoptera : Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. Ed. por Luko Hilje y Orlando Arboleda. Turrialba, Costa Rica. CATIE. p. 50-53. (Serie técnica. Informe técnico / CATIE; no. 205)

CASTAÑO-ZAPATA, J., DEL RIO, L., LARA, S.M.; PERDOMO, E.M. 1993. Fitopatología: Práctica de laboratorio. El Zamorano, Honduras. s.n.t. s.p.

CATIE (C.R.). 1993. Guía par el manejo integrado de plagas del cultivo de chile dulce. Turrialba, Costa Rica. Editorama S.A. 144 p. (Serie técnica, Informe No. 201)

EDWARDSON, J.R. y CHRISTIE, R.G. 1997. Viruses Infecting Peppers and Other Solanaceous Crops. Gainesville, Fla. University of Florida-IFAS. p. 1-5.

ESPINOSA, H.R. 1991. Método para diagnosticar virus de cucúrbitas en áfidos. In Tercer taller centroamericano en fitoprotección del melón (1991, 8-9 Agosto, Zamorano, Honduras). Ed. por Lorena Lastres, Mario Contreras y Alfredo Rueda. Zamorano, Honduras. DPV-EAP. p. 11. (Publicación DPV-EAP No. 445.)

GERGERICH, R.C. s.f. Virology-Biocontrol laboratory. s.n.t. s.p.

GLADSTONE, S. 1999. Plagas de cucurbitáceas. Apuntes de clase de plagas de cultivos tropicales I. Zamorano, Honduras.

GREEN, S.K.; KIM, J.S. 1991. Characteristics and control of viruses infecting peppers: a literature review. Taipei, Taiwan. Asian Vegetable Research and Development Center. 60p. (Technical Bulletin No. 18)

GUERRA, M.L. 2000. Caracterización agronómica y molecular de la reacción de geminoplasma de tomate y frijol común a geminivirus. Proyecto especial del Programa Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 62 p.

HILJE, L. 1996. Metodología para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 150 p. (materiales de enseñanza / CATIE; no.37)

HILJE, L.; ARBOLEDA, G. 1993. Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 67 p. (Informe técnico CATIE No. 205).

HERINGTON, J. 1997. Polymerase chain reaction.
<http://bioserve.latrobe.edu.au/vcebiol.cat2/pcpic.html>.

HUGHES, K. 1999. Gel electrophoresis for separation of DNA molecules.
<http://wcb.utk.edu/~khughes/GEL/sld001.htm>.

LASTRES, L. 1991. Generalidades sobre los virus no persistentes de las cucurbitas. El melonero (Hon.) (1) : 1-4

_____, L. 1992. Notas sobre nuevos tratamientos post cosecha y diagnóstico. El melonero (Hon.) (2) : 1-2

_____, L. 1992. Alternativas para el control de virosis. El melonero (Hond.). (5) : 1-4

MONTERROSO S., D.; BUSTAMANTE P., M.R. 1986. Aspectos generales del desarrollo agrícola y principales problemas fitosanitarios de los cultivos en la República de Honduras (a nivel de reconocimiento). Turrialba, C.R. CATIE. 61 p. (Informe técnico No. 128.)

MONTES L., A. ¿1992? Cultivos de hortalizas en el trópico. Zamorano, Honduras. Zamorano Academic Press. 208 p.

RAMIREZ, O. 1992. La problemática actual de las moscas blancas en América Central y el Caribe. In IV taller centroamericano en fitoprotección del melón (1992, 27-28 Agosto, Managua, Nicaragua). Ed. por Lorena Lastres de Rueda. Zamorano, Honduras. DPV-EAP. p. 12. (Publicación DPV-EAP No. 483)

RANDLES, J. 1998. Dot immunobinding assay and western analysis for virus detection and identification. In molecular tools for plant pathogen diagnosis (1998, 9 - 13 Febrero, Glen Osmond, Australia). Ed. por Richard AJ Hodgson. Glen Osmond, Australia. University of Adelaide. p. 104-106

RODRÍGUEZ ESTRADA, C. ¿1999? Diagnóstico de producción, consumo y comercialización de hortalizas en Honduras. Honduras. REDCAHOR / IICA. s.n.t. 74 p.

SLISH, D.F. 2000. The polymerase chain reaction.
<http://www.plattsburgh.edu/faculty/Slishdf/PCR.html>.

SMITH, D. 1999. PCR: polymerase chain reaction.
<http://www.biology.ucsd.edu/others/dsmith/classes/pcr.html>.

SPONAGEL, K.W.; FUNEZ, M.R. 1994. Estrategias probadas de manejo del complejo sanitario moscablanca / virus gemini en la producción de tomate. La Lima, Honduras. FHIA. 58 p.

VALVERDE, R. 1999. Plant virus diagnostic.
<http://www.lsu.edu/guest/wwwppc/valverde.htm>.

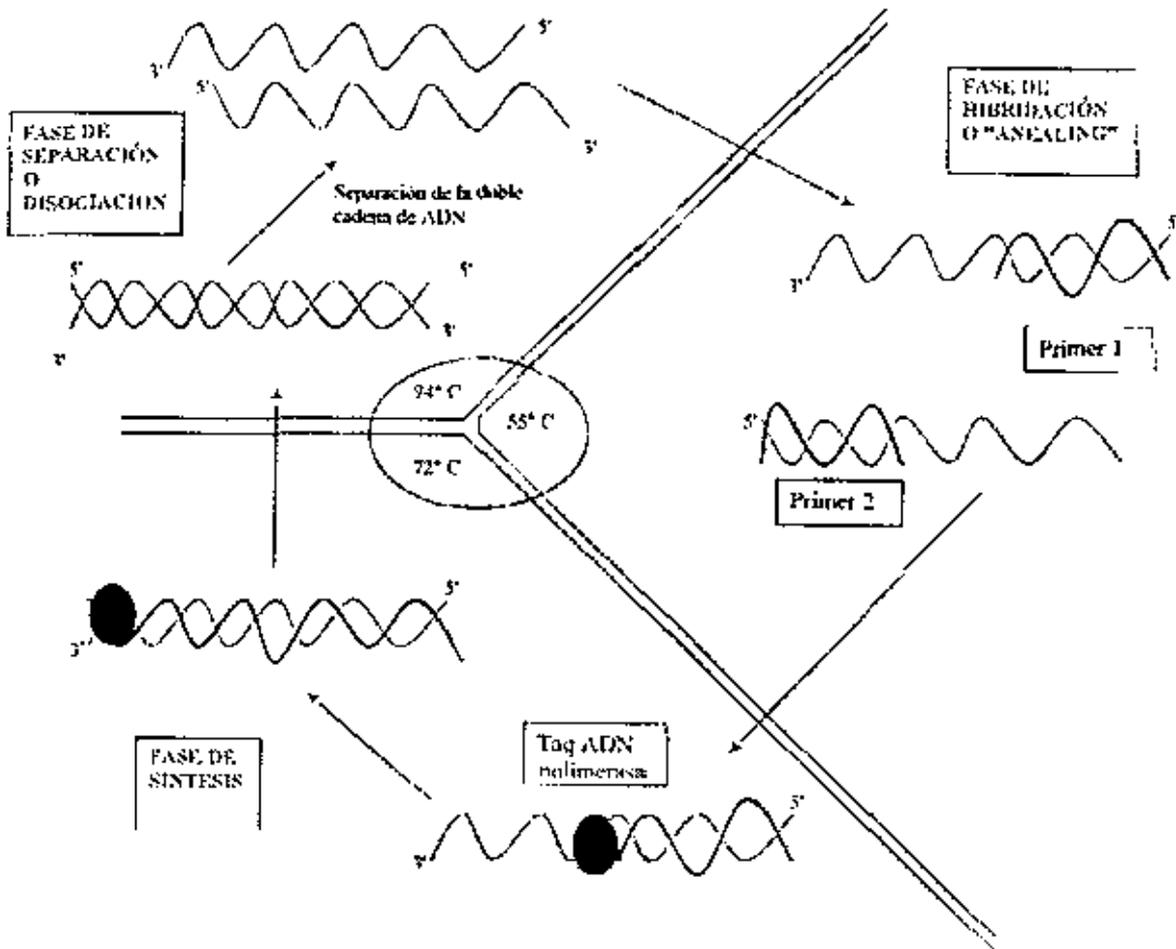
WYATT, S.D.; BROWN, J.K. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology (USA). 86:1288-1293.

YOON, J.Y.; GREEN, S.K.; TSCHANZ, A.T.; TSOU, S.C.S.; CHANG, L.C. 1989. Pepper improvement for the tropics: problems and the AVRDC approach. In Tomato and pepper production in the tropics. International symposium on integrated management practices (1988, 21-26 March, Tainan, Taiwan). Edited by S. K. Green. Shanhua, Taiwan. *s.n.* p. 86-98. (Asian Vegetable Research and Development Center publication No. 89-317)

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. 1996. Compendium of cucurbit diseases. St. Paul, Minnesota, USA. American Phytopathological Society Press. 87 p.

8. ANEXOS

Anexo 2. Amplificación de ADN



Anexo 3. Extracción de ADN total (Planta y Viral), modificación de Doyle & Doyle (1990), FOCUS 12 (1): 13-15. Extracción Miniprep de ADN

Procedimiento:

1. Anotar la información de la muestra.
2. Pesar 0.1 a 0.2 g de tejido de la planta y anotar su peso en el libro. Seleccionar el crecimiento de nuevas hojas cuando sea posible. Las muestras en glicerol pueden remojar en agua por 5 min. antes de macerarse.
3. Macerar el tejido en un mortero con aproximadamente 5-10 mg de alumina. Moler el tejido completamente pero con cuidado de no dejar que el tejido se derrita. Alternativamente, se puede moler adicionando 700 a 800 μ l de CTAB a 65 °C con la arena (o una relación de tejido: buffer CTAB de 1:3-5). Incubar en baño maría a 60 °C por 30 min.
4. Dejar que los tubos se enfríen por 3 min en una cámara de flujo laminar, y luego adicionar 1 volumen (750 μ l) de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), e invertir para mezclar.
5. Centrifugar a 9,000 RPM por 10 minutos para separar las fases.
6. Remover y transferir con micropipeta la fase superior acuosa a un nuevo tubo microcentrifuga. Descartar la capa orgánica en cloroformo en un recipiente aparte.
7. Adicionar 2/3 partes de volumen de isopropanol frío (almacenado en el congelador), cerrar el tubo y suavemente invertir para mezclar (precipita los ácidos nucleicos). Incubar a temperatura ambiente por toda la noche.
8. Centrifugar a 9,000 RPM por 10 min. Cuidadosamente decantar el sobrenadante (el sedimento puede estar suelto). Pipetear cualquier líquido remanente con micropipeta.
9. Adicionar 100 μ l de wash buffer o buffer de lavado (es variable de acuerdo al peso de tejido utilizado y sustituye la sal CTAB con sal de amonio) directamente al sedimento, mezclar e incubar por 20 min. a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 9,000 RPM por 5 minutos.
Nota: Si la muestra se observa sucia, se puede repetir el paso 10 al 11 (centrifugar).
11. Decantar el sobrenadante y colocar los tubos en una incubadora a 37 °C por 30-60 min., o dejar secar en una cámara de flujo laminar por 30 min. hasta que el ADN se observa casi transparente.
12. Resuspender el sedimento en 50 μ l (variable según peso de la muestra) de agua destilada estéril. Almacenar a 4 °C.

Materiales: Buffers**Buffer de Extracción CTAB:**

	1X	Mitad
NaCl (1.4 M)	81.82 g	40.91 g
EDTA (20 mM)	7.44 g	3.72 g
Trizma (mw 121.1:100 mM)	12.1 g	6.05 g

Disolver los reactivos en aproximadamente 1.7 L de agua destilada (850 ml si es para la mitad). Disuelva calentando hasta casi el punto de ebullición y luego adicione 40 g (2 %) de CTAB (Bromuro Hexadeciltrimetilamonio) o 20 g de CTAB si es para la mitad, y mezcle hasta disolver. Enfríe a temperatura ambiente y ajuste a pH 8.0 con HCl concentrado. Autoclave y almacene a 65 °C.

Antes de usar: Adicione 4 ml (2 ml si es la mitad) de 2-mercaptoetanol (0.2 %: 2-ME). Devuelva a la incubadora, cierre muy bien para evitar la evaporación.

Buffer de Lavado:

	100.0 ml	10.0 ml
95 % etanol (76 %)	79.0 ml	7.9 ml
8 M NH ₄ Oac (10 mM)	0.125 ml	12.0 µL
Agua destilada	20.0	2.0 ml

Almacenar en el congelador a -20 °C.

TE Buffer:

	500.0 ml
Trizma base (mw 121.1: 10 mM)	1.21 g
EDTA (1 mM)	0.185 g
Agua destilada	500.0 ml

pH 8.0 con HCl concentrado

Autoclave y almacenar a temperatura ambiente o a 4 °C.

Laboratorio Molecular de Fitopatología, DPV, Zamorano, 1999

**Protocolo de PCR para Diagnóstico de Geminivirus
utilizando PCR Ready-to-go Beads**

Set de Primers Universales de Judy Brown (514/1048)

	<u>Mezcla para 1 Reacción</u>
Agua destilada	24.0 μ L
Primer 514	0.5 μ L
Primer 1048	0.5 μ L
 Total	 25.0 μ L

Se obtienen 2 reacciones de cada PCR tube, por lo tanto, una vez que se ha adicionado 25.0 μ L de la mezcla (agua con primers), se permite que los reactivos se homogenicen y se transfiere posteriormente 12.5 μ L de esta mezcla a un tubo estéril (0.5 μ L). Asegurándose de haber rotulado cada tubo microcentrífuga con el número correspondiente a la muestra, se adiciona 2.0 μ L de ADN (5.0 ng/ml) de la muestra o 1.0 μ L de ADN de concentración desconocida. Se mezcla bien con la micropipeta y se le agrega una gota de aceite mineral estéril.

Condiciones de PCR en termociclador:

File (archivo) 35 (1 ciclo)	94 °C – 3:00 min
File 36(30 ciclos)	94 °C – 1:00 min
	58 °C – 1:00 min
	72 °C – 1:00 min
File 33 (1 ciclo)	72 °C – 5:00 min
File 7	4 °C – 00

Anexo 4. Protocolo de la prueba de ELISA indirecta proporcionado por AGDIA

PATHOSCREEN KIT
AGDIA

ELISA INDIRECTA

1. PREPARANDOSE PARA LA PRUEBA

- Diluya los buffers concentrados proveídos con el kit a su dilución de trabajo (1X) con agua destilada. Prepare 1X buffer para un día.
- Usando un marcador permanente, numere las franjas en caso de que una se separe del marco.
- Doble un papel toalla para acoplarse dentro de una caja plástica hermética. Ponga el papel roalla doblado en el fondo de la caja, luego agregue suficiente agua para mojar el papel toalla. Mantener el plato en esta caja húmeda durante los pasos de incubación ayudará a prevenir la evaporación de las muestras húmedas.

2. DIAGRAMA DE PROCESAMIENTO

Haga una copia del diagrama y registre la localización de sus muestras y controles. Es recomendable que se use una celda de buffer y una de control positivo en cada plato, cada vez que procese muestras.

3. MUESTRAS MACERADAS Y DILUIDAS

- Cuando sea posible, seleccione tejidos que muestren síntomas para la prueba. Remueva cualquier residuo de suelo del tejido a ser probado.

NOTA : contaminación con suelo puede interferir con los resultados.

- Puede usarse mortero y pistilo o cualquier otro objeto que permita macerar las muestras. Si está usando un mortero y un pistilo, lávelo y enjuáguelo exhaustivamente entre muestras.
- Cuando se haya extraído la savia de la planta, dilúyalo en buffer de extracción e muestras indirecto con una proporción 1: 10 (volumen de savia: volumen de buffer).

POTYVIRUS :

Se puede macerar el tejido de la planta en buffer de extracción de muestras indirecta con una concentración 1: 10 (peso del tejido : volumen de buffer). Si se está probando Potyvirus transmitidos por áfidos usando el número de sistema 27200, macerar con una concentración 1 : 100. Si es Asparagus virus 2, usando número de sistema 71000, macere a una concentración 1: 200.

Se necesitará cerca de 100 ul de extracto de muestra diluida por celda, más una cantidad adicional para asegurar su fácil repartición. Una manera conveniente para preparar esta muestra diluida es medir 100 ul de savia no diluida en un pequeño tubo de prueba, luego añadir 1 ml de buffer de extracción de muestras indirecta.

4. REPARTICIÓN DE MUESTRAS

- Siguiendo el diagrama, se debe repartir 100 μ l de la muestra preparada en las celdas. Coloque 100 μ l de control positivo en su celda correspondiente y 100 μ l de buffer de extracción en la suya.

5. INCUBAR PLATO

- Ponga el plato en la caja húmeda e incube por una hora.

6. PREPARAR EL ANTICUERPO

- Unos pocos minutos antes de que se complete la incubación, prepare el anticuerpo usando buffer ECI 1X y la ampolla de anticuerpo.
- Primero, coloque Buffer ECI 1X, luego el anticuerpo de acuerdo a la dilución dada en la etiqueta.
- EL volumen de buffer ECI 1X requerido depende del número de celdas a usar, con 100 μ l requeridos por celda. Para estimar el volumen necesario prepare 1 ml por cada 8 celdas a usar o 10 ml por el plato de 96 celdas.
- Se debe calcular el volumen de anticuerpo requerido basado en el volumen de buffer ECI 1X usado y en las diluciones dadas en la botella. Use una nueva punta estéril de pipeta por cada botella para prevenir contaminación.
- Luego de añadir el anticuerpo, mezclar bien.
- Coloque el anticuerpo preparado a un lado. Se lo necesitará luego de lavar el plato.

7. LAVAR EL PLATO

- Cuando la incubación de la muestra se ha completado, lave el plato. Mientras se sostiene los lados largos del marco para mantener las franjas en su lugar, usar un movimiento de sacudida rápida para arrojar las celdas en un fregadero o en un contenedor de residuos, sin mezclar los contenidos.
- Llène hasta el tope las celdas con PBST 1X, vacíelas nuevamente. Repetir de 4 a 8 veces.
- Luego de lavar, mantener el marco boca abajo y golpearlo firmemente contra un papel toalla doblado para secar las celdas.

8. AÑADIR ANTICUERPO

- Añada 100 μ l de anticuerpo preparado por celda.

9. INCUBAR PLATO

- Poner el plato dentro de la caja húmeda por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración a 4°C

10. PREPARAR CONJUGADO DE ENZIMA

- Pocos minutos antes de que se complete la incubación, prepare conjugado de enzima usando buffer ECI 1X y la ampolla de enzima conjugada.
- Primero, coloque el buffer y luego añada el conjugado de la enzima de acuerdo a la dilución dada en la etiqueta.

- Prepare el mismo volumen de enzima conjugada como de anticuerpo.
 - Calcular el volumen requerido de conjugado basado en el volumen de buffer ECI 1X y en las diluciones dadas en la botella. Use una nueva punta por cada botella para prevenir contaminación.
 - Después de añadir el conjugado de la enzima, mezclar bien.
 - Ponga el preparado de enzima a un lado, lo necesitará después de lavar el plato.
- Nota : Siempre prepare el conjugado de enzima entre los 10 minutos antes de su uso.

11. LAVAR PLATO

- Como antes, lave el plato 4 a 8 veces con PBST 1X

12. AÑADIR ENZIMA CONJUGADA

- Coloque 100 μ l de preparado de conjugado de enzima por celda.

13. INCUBAR PLATO

- Incubar el plato por 1 hora a temperatura ambiente.

14. PREPARAR SOLUCION PNP

- Cada tableta PNP hará 5 ml de solución PNP, a una concentración de 1mg/ml, suficiente para 5 franjas de 8 celdas.
- Aproximadamente 15 min antes del final de la incubación, medir 5 ml de buffer PNP 1X a temperatura ambiente por cada tableta que se use. Luego, sin tocar las tabletas, agregue las tabletas PNP al buffer.

NOTA : No tocar las tabletas PNP o exponer la solución PNP a luz fuerte. Luz o contaminación puede causar color de fondo en celdas negativas.

15. LAVAR PLATO

- Como antes, lavar plato 4 a 8 veces con PBST 1X

16. AÑADIR SOLUCION PNP

- Colocar 100 μ l de solución PNP 1X por celda.

17. INCUBAR REACCION

- Incubar el plato por 30-60 minutos en una caja húmeda.

18. PARAR REACCION

- Añada 50 μ l de NaOH 3M a cada celda. Este paso es opcional. Al añadir NaOH detiene el desarrollo de color, pero el plato puede ser interpretado visualmente o con un lector de plato sin este paso.

19. EVALUAR RESULTADOS

- Examine las celdas al ojo o mida en un lector de plato a 405 nm.
- Celdas en las que hay desarrollo de color, indican resultados positivo.
- Resultados de prueba son válidos sólo si el control positivo da un resultado positivo y el buffer se mantiene claro.
- Resultados deberán ser interpretados después de más de 60 min. De incubación mientras las celdas negativas se mantengan claras

Anexo 5. Protocolo para la prueba DIBA.

DOT INMUNOBINDING ASSAY (DIBA)

Tomado de Randles (1992)

Preparación del antígeno:

- Tome muestras ya pesadas de las hojas jóvenes de las plantas a analizar, colóquelas en el fondo de bolsas de plástico, agregue un volumen igual de PBS (P/V) y macere la hoja.
- Suspenda la bolsa para permitir que la fibra se sedimente.
- Pipetee el sobrenadante en tubos para microcentrifuga.
- Clarificar por centrifugación a 10,000 RPM por 2 minutos.
- Realice diluciones dobles consecutivas de cada muestra en una serie de tubos, usando PBS como diluyente.

Preparación de la Membrana para DIBA:

- Corte un pedazo de membrana de nitrocelulosa para obtener cuadros de 6*12; no tocar con los dedos.
- Aplique 1µl de la muestra, por duplicado. Anote el patrón u orden.
- Deje secar, y si es necesario almacene entre papel filtro a -20 °C.
- La membrana puede rotularse en el borde con un lápiz.

Detección del antígeno:

Bloqueo:

- Saturar los sitios de unión de la proteína colocando las membranas en una placa petri con Buffer B de bloqueo (contiene el equivalente de 1% de caseína y antígeno de planta sana para absorber los anticuerpos no-virales).
- Incubar por 15 minutos a 37 °C, con rotación suave.

Unión del anticuerpo:

- Descartar el Buffer de bloqueo, reponer con anticuerpo específico.
- Incubar por 30 minutos a 37 °C, con rotación suave.

Lavado:

- Lavar en Buffer A de bloqueo; 3 veces por 3 minutos.

Unión del conjugado:

- Escurrir. Agregar el conjugado anti-conejo-fosfatasa diluido 1/1000 en PBS + 1% BSA.
- Incubar a 37 °C por 30 minutos con rotación suave.

Lavado:

- Lavar 2 veces por 3 minutos en AP 7.5
- Lavar 2 veces por 3 minutos en AP 9.5 a temperatura ambiente.

Reacción:

- Mezclar con el sustrato, adicionar a la membrana.
- Incubar en oscuridad (con poca luz) hasta que los puntos azules aparezcan y parar la reacción antes que aparezca color de fondo.

Parada:

- Eliminar sustrato y adicionar Stop Buffer

Registrar los resultados de acuerdo a la intensidad de los puntos. Describir los límites de detección de la prueba; i. E. La dilución final de la muestra infectiva. Si la reacción es comparada con savia de una planta sana, cual dilución parece dar la reacción óptima.

REACTIVOS

- Phosphate Buffered Saline (PBS):

8	g/l	NaCl
0.2	g/l	KH ₂ PO ₄
1.15	g/l	Na ₂ HPO ₄
0.2	g/l	KCl (pH 7.4)
- Buffer A de Bloqueo:

Al PBS agregar leche en polvo descremada a una concentración de 2.6% (P/V).
- Buffer B de Bloqueo:

A 9 ml de Buffer A de Bloqueo agregar 1 ml de savia de planta sana. Centrifugar a 3,000 RPM por 5 minutos para sedimentar el debri de la planta.
- Buffer de lavado AP 7.5

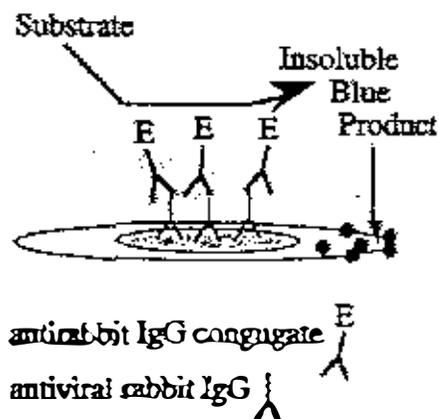
0.1	M	Tris-HCl pH 7.5
0.1	M	NaCl
2	ml/l	MgCl ₂
0.05%	v/v	Triton 100X
- Buffer de Lavado AP 9.5

0.1	M	Tris-HCl pH 9.5
0.1	M	NaCl
5	mM	MgCl ₂

- Stop Buffer:
10 mM Tris-HCl pH 7.5
5 mM EDTA
- Antisuero para el anticuerpo: diluido 1/250 en Buffer B de bloqueo.
- Fosfatas alcalina conjugada a gamma-globulina anti-conejo: Diluida a concentración de trabajo apropiada (1/100) en PBS + 1% P/V de BSA (Bovine Serum Albumin).
- Soluciones Stock de fosfatasa (sustrato)
Inmediatamente antes de usar adicione 44 μ l de NBT y 33 μ l de BCIP a 10 ml de AP9.5

NBT: Tetrazolio Nitro azul (75 mg/ml en 70% dimetilformamida)

BCIP: Fosfato Bromo-4-cloro-3 indolil (50 mg/ml en 100% de dimetilformamida)



Fuente: Randles, 1998.

Muestra	Ena	Cl	Am	M	Mo	Ar	VI	Observaciones	Diagnóstico visual	Resultados PCR geminivirus	Resultados ELISA potyvirus
VET-CNC-190		XX	X			X			CMV Cucumovirus	Positivo	
VET-CNC-191	X	X				X			PVMV Tobamovirus	Positivo	
VET-CNC-192	X		XX	X		X	XX		TEV Potyvirus	Positivo	
VET-CNC-193			X	XX			X		Tigre disease Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-194			X	XX		X			SGMV Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-195	X	X				XX	XX	Mucho brote basal	Texas pepper geminivirus	Positivo	
VET-CNC-196			X	XX		X			SGMV Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-197				X		X		Mosaico basal	Tigre disease Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-198	XX	XX				XX	XX		Tigre disease Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-199				XX		X			SGMV Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-200		X					X		PVMV Potyvirus	Positivo	
VET-CNC-201	XX		XX		X	XX	XX		Tigre disease Geminivirus	Positivo	
VET-ZCC-202	X		XX	X		X	X		SGMV Geminivirus	Positivo	

Muestra	Ena	CI	Am	M	Mo	Ar	VI	Observaciones	Diagnóstico visual	Resultados PCR geminivirus	Resultados ELISA polyvirus
VET-ZCC-203	XX	XX		X		X			SGMV Geminivirus	Positivo	
VET-ZCC-204			X				XX	Deformación foliar severa	Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-ZCC-205			X	XX		X			SGMV Geminivirus	Positivo	
VET-ZCM-206								<i>Amaranthus hybridus</i>			
VET-ZCC-207		X	XX			X			Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-ZBC-208	X	X	X			X			Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-ZBC-209	X	X	X			X			Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-210						X			Tiger disease Geminivirus		
VET-CNC-211	X	XX		X		XX	XX	Hojas frágiles	Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-212		X	X			X			Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-213	X			XX		X			SGMV geminivirus	Positivo	
VET-CNC-214		X	X			X			Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-215		X							Tiger disease Geminivirus	Positivo	

Muestra	Ena	Cl	Am	M	Mo	Ar	VI	Observaciones	Diagnóstico visual	Resultados PCR geminivirus	Resultados ELISA potyvirus
VET-CNC-216	X			XX		X			SGMV Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-217								Asintomática		Positivo	
VET-CNC-218	X			X			X	Deformación foliar severa	Texas pepper geminivirus	Positivo	
VET-CNC-219				X					Texas pepper geminivirus	Positivo	
VET-CNC-220	XX	X				XX	XX		Tigre disease Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-221		XX	XX						Texas pepper geminivirus	Positivo	
VET-CNC-222	X			X		X			SGMV Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-223			XX						Tigre disease Geminivirus	Positivo	
VET-CNC-224	XX	X	XX				XX		Texas pepper geminivirus	Positivo	
VET-CNC-225								Asintomática			
VET-ZCC-226		X				X			Tigre disease Geminivirus	Positivo	
VET-ZCC-227		X	X			XX	X		Tigre disease Geminivirus	Positivo	
VET-ZCC-228			X				X		PVY Potyvirus		
VET-ZCC-229			XX		X		XX	Fruto deforme	Tigre disease Geminivirus	Positivo	

Muestra	Ena	Cl	Am	M	Mo	Ar	VI	Observaciones	Diagnóstico visual	Resultados PCR geminivirus	Resultados ELISA potyvirus
VET-ZCC-230			X		X		XX	Fruto deforme	Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-ZCC-231	X		XX		X		XX	Fruto deforme	Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-ZCC-232	X	X	X				X	Fruto deforme hojas redondas	Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-ZCC-233	X		X			XX		Fruto deforme	PMoV Potyvirus	Positivo	
VET-ZCM-234			X				XX	<i>A. hybridus</i>			
VET-ZCC-235	XX	X				XX			Texas pepper geminivirus	Positivo	
VET-ZCC-236	XX	XX	XX				X	Fruto deforme hojas rígidas y acucharadas	Tiger disease Geminivirus	Positivo	
VET-ZCC-237								Asintomática			
VET-ZCC-238			X	X					PMoV Potyvirus	Positivo	
VET-ZCC-239				XX					TSWV Tospovirus	Positivo	

Ena: Enanismo; Cl: Clorosis; Am: Ampollamiento; M: Mosaico; Ar: Arrugamiento; VI: Venas Irregulares; XX: severo; X leve

Muestra	Ena	Cl	Am	M	Mo	Ar	VI	Observaciones	Diagnóstico visual	Resultados PCR geminivirus	Resultados ELISA polyvirus
VS-240	X	XX		X		X		Hojas achicharradas	ZYMV		
VS-241		X	X			X		Clorosis de afuera a dentro	ZYMV		Positivo
VS-242	XX					X			ZYMV		Positivo
VS-243	X	XX							ZYMV		
VS-244	X				X			Hojas deformes	CMV		
VS-245	X		X		X			No hay hojas jóvenes	WMV2		
VS-246	X	X							ZYMV		
VS-247	X	X				XX		áfidos y hojas raquíticas	CMV		
VS-248	X	X				X			ZYMV		
VS-249								Asintomática			
VS-250	X	X	X			XX			CMV		Positivo
VS-251	X	X				X		Diferentes tonos del color verde	CMV		
VS-252	XX	X	X						ZYMV		Positivo
VS-253	X	X	XX			XX			CMV	Positivo	
VS-254		X	X					Puntas de hojas quemadas	WMV2	Positivo	
VS-255		XX							CMV	Positivo	
VS-256	XX								ZYMV		

Muestra	Ena	Cl	Am	M	Mo	Ar	VI	Observaciones	Diagnóstico visual	Resultados PCR geminivirus	Resultados ELISA potyvirus
VS-257		X				X		Deformidad severa	ZYMV		
VS-258	X					X		Tallo delgado	ZYMV		
VS-259								Asintomática			
OS-260		X	XX					Ampollas verde oscuro	WMV2		Positivo
OS-261			X					Hoja deforme	WMV2		
OS-262		XX				XX		Clorosis de afuera a adentro	ZYMV		
OS-263			XX			XX			ZYMV		
OS-264			XX			X		Cogollo vertical	Fitotoxicidad		
OS-265		X	XX			X		Hojas arrugadas para atrás	CMV		
OS-266						XX		Hojas "cerradas"	ZYMV		
OS-267		XX				X		Aparente deficiencia	<i>Cladosporium cucumerinum</i> + ZYMV		Positivo
OS-268	X				X	X		Afidos	ZYMV	Positivo	Positivo
OS-269								Asintomática			
OS-270			X			XX		Tallo oscuro	ZYMV		
OS-271			X					Hoja deforme	ZYMV		
OS-272						XX		Tallos oscuro	Fitotoxicidad		
OS-273	X	X	XX			XX		Puntas de hojas quemadas Tallo oscuro	CMV		
OS-274	X	X	X						ZYMV		

Muestra	Ena	Cl	Am	M	Mo	Ar	VI	Observaciones	Diagnóstico visual	Resultados PCR geminivirus	Resultados ELISA potyvirus
OM-275	X	X	X			X		Solo en hojas infectadas			
OS-276		X	X					Clorosis en puntas cogollo vertical	ZYMV		Positivo
OS-277								Asintomática			
OS-278		X	X					Hojas pálidas	WMV2		Positivo
OS-279			XX			X		Deformidad	ZYMV		

Ena: Enanismo; Cl: Clorosis; Am: Ampollamiento; M: Mosaico; Ar: Arrugamiento; VI: Venas Irregulares; XX: severo; X :leve