

BIBLIOTECA WILSON POPINOA  
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA  
APARTADO 93  
TEGUIGALPA HONDURAS

# Caracterización agronómica y molecular de la reacción de tomate y frijol común a geminivirus

María Luisa Guerra

|            |       |
|------------|-------|
| Fecha:     | _____ |
| FECHA:     | _____ |
| ENCARGADO: | _____ |

**ZAMORANO**

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria  
Protección Vegetal

Abril, 2000

#1095

# **Caracterización agronómica y molecular de la reacción de tomate y frijol común a geminivirus**

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

presentado por

**María Luisa Guerra**

**Zamorano, Honduras**  
Abril, 2000

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.

María Luisa Guerra  
María Luisa Guerra

Zamorano, Honduras  
Abril, 2000

## DEDICATORIA

A mis padres y hermanas,

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por sentir su presencia, fuerza y amor cada día.

A Karla Cruz, Antonio Jaco y Maximino Rocha por ser mis compañeros de trabajo.

A Lourdes Gaitán y Carolina Galo por estar siempre con una sonrisa y la disposición de ayudar.

A la Sección de Maquinaria Agrícola, en especial a Rodney Lagos y Francisco Alvarez, por trabajar por mí en los momentos imprescindibles.

Al Programa de Investigación en Frijol, especialmente a Edwin Flores, Araceli Castro y todos los trabajadores por brindarme su toda su ayuda.

A Jose Luis por haber sido incondicional en su apoyo, ayuda y desvelos para lograr este trabajo.

A mis amigos Vanessa Q., Jimena P. de L., Andrea C., Bárbara H., Zoila A., Alejandra S., Jose Luis G., Gonzalo G., Diego A., Héctor F., Marco P., Juan Pablo F., Lenin G., Rodrigo D. por haberme dedicado su amistad en estos cuatro años.

A la Familia Fiallos-Salmerón y González-Morazán por haberme acogido en sus bondadosos hogares.

A Michelle Oquendo, Belén Díaz, Leonel González y Christian Oquendo por hacerme sentir que las amistades van más allá del tiempo y el espacio.

A mis asesores por su dedicación.

## AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Agradezco a mis Padres por haberme apoyado en hacer realidad un sueño.

Al Instituto Ecuatoriano de Crédito Educativo y Becas por contribuir financieramente para la realización de mis estudios en Zamorano.

Al programa Bean-Cowpea/CRSP por el financiamiento brindado para continuar mis estudios en el programa de ingeniería agronómica.

A la Fundación Wilson Popenoe por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios en el programa de agrónomo.

A Zamorano (FOGE), por su apoyo financiero durante el programa de agrónomo.

## RESUMEN

Guerra, María Luisa 2000. Caracterización agronómica y molecular de la reacción de germoplasma de tomate y frijol común a geminivirus. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 63 p.

Desde la década de los 80's, la producción de cultivos agronómicos y hortícolas han sido gravemente amenazados por la presencia de mosca blanca como insecto vector en el complejo con geminivirus. Recientemente, se ha determinado que el frijol común es reservorio de una cepa del virus de la hoja amarilla en cuchara del tomate (geminivirus) (TYLCV, siglas en inglés). Se probó la resistencia genética de germoplasmas como una alternativa de manejo para el complejo mosca blanca-geminivirus. En agosto de 1999, se evaluaron en Zamorano cuatro líneas mejoradas, no comerciales, de tomate de origen israelita tolerantes a geminivirus TY-197, TY-198, TY-8479 y TY-8933; su desempeño se comparó con PETO 98 utilizada como variedad testigo. En noviembre del mismo año, se sembraron seis variedades de frijol común, tres con resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (geminivirus) (VMDF), Tío Canela 75, Dorado, Don Silvio; y tres susceptibles, Catrachita, Desarrural (1R) y Danlí 46. Se realizaron muestreos de mosca blanca a lo largo del ciclo de los cultivos para entender la epidemiología del complejo viral, y se recolectó tejido vegetal para ser analizado mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, sus siglas en inglés). Se utilizaron los "primers" de la Universidad de Wisconsin para la detección de geminivirus universal, TYLCV y VMDF. En el tomate se encontró un alto porcentaje de plantas infectadas con geminivirus y se obtuvieron resultados positivos a TYLCV, geminivirus anteriormente no reportado en Centroamérica. Para corroborar este hallazgo, es necesario secuenciar el ADN del virus. Esto tiene repercusiones importantes para la industria tomatera en la región, ya que el TYLCV constituye la limitante fitosanitaria de producción más importante. Las líneas TY-198, TY-8479 y TY-8933 mostraron los niveles más bajos de incidencia de infecciones virales y los mejores rendimientos, sin diferencia entre ellas ( $P < 0.05$ ). En el frijol, se encontró un bajo porcentaje de plantas infectadas con geminivirus y VMDF, debido a las condiciones poco favorables (bajas temperaturas) al vector. Las variedades Tío Canela 75, Dorado, Don Silvio y Catrachita mostraron los niveles más bajos de incidencia de infección viral y los mejores rendimientos, sin diferencia entre ellas ( $P < 0.05$ ). Un 90% de las muestras resultaron negativas a geminivirus, indicando la presencia de otro tipo de virus no transmitido por mosca blanca. El uso de germoplasma mejorado y la siembra en época no favorable al vector, son técnicas eficaces a corto plazo para el manejo de geminivirus como limitante de producción.

**Palabras claves:** *Bemisia tabaci*, mosca blanca, resistencia, TYLCV, virus fitopatógenos, VMDF.

## Nota de Prensa

### VARIETADES RESISTENTES PARA EL MANEJO DE VIRUS: UNA ALTERNATIVA A CORTO PLAZO

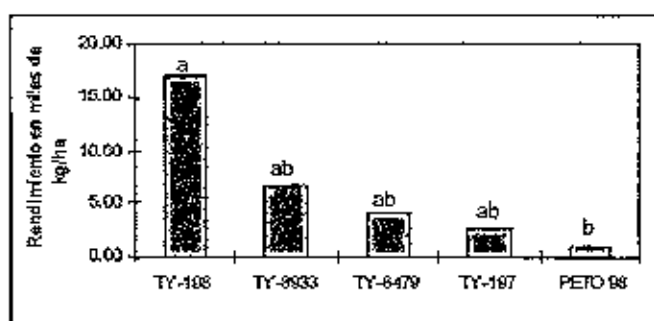
Los geminivirus son un tipo de virus que afectan a plantas y son transmitidos por la mosca blanca. Pueden llegar a mermar la producción de hortalizas y cultivos agronómicos hasta en 100%.

Actualmente, la técnica de manejo más usada por los agricultores es la aplicación de químicos para combatir a la mosca blanca, muchas veces usados indiscriminadamente. Los resultados son conocidos: resistencia de la mosca blanca a nuevos insecticidas, intoxicaciones humanas, contaminación de agua y frutos no aptos para el consumo humano.

Varietas resistentes de tomate y frijol a geminivirus fueron evaluadas en Zamorano. Los resultados fueron sorprendentemente satisfactorios comparados con variedades susceptibles a esta enfermedad.

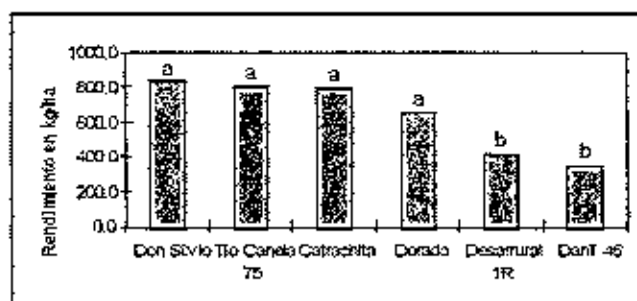
Se evaluaron cuatro nuevas variedades, no comerciales, de tomate de origen israelita, en los meses de Agosto a Octubre de 1999. Las variedades TY-198, TY-8933 y TY-8479 mostraron los mejores rendimientos (Figura 1).

Figura 1. Rendimiento de cinco variedades de tomate



PETO 98, una variedad comúnmente usada en las principales zonas tomateras de Honduras mostró un desempeño muy bajo debido en gran parte a la presencia de geminivirus.

Figura 2. Rendimiento de seis variedades de frijol.



Además se reportó preliminarmente la presencia de un nuevo virus, el Virus de las hojas amarillas en cuchara del tomate (TYLCV, siglas en inglés).

Para el diagnóstico del TYLCV se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa, una técnica que multiplica el ADN del virus para que sea más fácil detectarlo.

El TYLCV ocasiona las mayores pérdidas en tomateras en las zonas donde está presente. Probablemente es el geminivirus de tomate más agresivo existente hasta el momento.

En el caso del frijol, el experimento también se llevó a cabo en Zamorano (en los meses de Noviembre de 1999 a Enero de 2000), después de la cosecha del tomate.

Las variedades resistentes contra el Virus del Mosaico Dorado del Frijol (VMDF) (geminivirus), Tío Canela-75, Dorado y Don Silvio, presentaron los mejores rendimientos juntamente con Catrachita, una variedad susceptible al VMDF (Figura 2). Este resultado sugiere la presencia de otro virus que no es geminivirus en las plantas de frijol. Esto principalmente se debió a la época de frío que no favorece a la mosca blanca.

El estudio determinó que las variedades resistentes a geminivirus y otros virus son un herramienta efectiva, y sobretodo que ayudará a reducir el exagerado uso de insecticidas, obteniendo rendimientos que nos permitan competir en el mercado.

## CONTENIDO

|  |      |
|--|------|
| Portadilla.....  | i    |
| Antoría.....   | ii   |
| Página de firmas.....                                    | iii  |
| Dedicatoria.....   | iv   |
| Agradecimientos.....                                     | v    |
| Agradecimientos a patrocinadores.....                    | vi   |
| Resumen.....   | vii  |
| Nota de prensa.....                                      | viii |
| Contenido.....   | x    |
| Índice de cuadros.....                                   | xiv  |
| Índice de figuras.....                                   | xv   |
| Índice de anexos.....                                    | xvi  |
| <br>   |      |
| 1. INTRODUCCION.....                                     | 1    |
| 1.2. OBJETIVOS.....                                      | 2    |
| 1.2.1. Objetivos generales.....                          | 2    |
| 1.2.2. Objetivos específicos.....                        | 2    |
| <br>   |      |
| 2. REVISION DE LITERATURA.....                           | 4    |
| 2.1. MOSCA BLANCA.....                                   | 4    |
| 2.1.1. Taxonomía.....                                    | 4    |
| 2.1.2. Biología.....                                     | 4    |
| 2.1.3. Morfología.....                                   | 5    |
| 2.1.4. Distribución geográfica.....                      | 5    |
| 2.1.5. Daño que ocasiona a los hospederos.....           | 6    |
| 2.1.5.1. Daño directo.....                               | 6    |
| 2.1.5.2. Daño indirecto.....                             | 6    |
| 2.1.6. Complejidad del problema.....                     | 6    |
| 2.1.6.1. Plasticidad genética.....                       | 6    |
| 2.1.6.2. Condición altamente polífaga.....               | 7    |
| 2.1.6.3. Vector de geminivirus.....                      | 7    |
| 2.1.6.4. Alta prolificidad.....                          | 8    |
| 2.2. GEMINIVIRUS.....                                    | 8    |
| 2.2.1. Taxonomía.....                                    | 8    |
| 2.2.2. Plantas hospederas de geminivirus.....            | 8    |
| 2.2.3. Morfología.....                                   | 9    |
| 2.2.4. Sintomatología.....                               | 9    |
| 2.2.5. Detección.....                                    | 10   |
| 2.2.5.1. Detección de la proteína viral.....             | 10   |
| 2.2.5.2. Detección del ADN viral.....                    | 10   |
| 2.2.5.3. Hibridación molecular.....                      | 10   |
| 2.2.5.4. Bioensayos de transmisión.....                  | 10   |
| 2.2.5.5. Observación de inclusiones virales.....         | 10   |
| 2.2.6. Manejo del complejo mosca blanca-geminivirus..... | 11   |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.7. Uso de variedades resistentes.....  | 12 |
| 2.3. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE ETIOLOGÍA<br>VIRAL DEL TOMATE Y FRIJOL COMÚN..... | 12 |
| 2.3.1. Tomate.....   | 12 |
| 2.3.2. Virus de las hojas amarillas en cuchara del tomate.....                     | 13 |
| 2.3.2.1. Taxonomía.....  | 13 |
| 2.3.2.2. Origen y distribución actual.....   | 13 |
| 2.3.2.3. Hospederos.....   | 13 |
| 2.3.2.4. Morfología.....   | 14 |
| 2.3.2.5. Biología.....   | 14 |
| 2.3.2.6. Síntomas.....   | 14 |
| 2.3.2.7. Manejo.....   | 14 |
| 2.3.3. Frijol.....   | 15 |
| 2.3.4. Virus del mosaico dorado del frijol (VMDF).....                             | 17 |
| 2.3.4.1. Taxonomía.....  | 17 |
| 2.3.4.2. Origen y distribución actual.....   | 17 |
| 2.3.4.3. Morfología.....   | 17 |
| 2.3.4.4. Biología.....   | 18 |
| 2.3.4.5. Hospederos.....   | 18 |
| 2.3.4.6. Síntomas.....   | 18 |
| 2.3.4.7. Manejo.....   | 18 |
| <br>   |    |
| 3. MATERIALES Y METODOS.....   | 19 |
| 3.1. DINAMICA POBLACIONAL DE MOSCA BLANCA<br>EN ZAMORANO.....                      | 19 |
| 3.1.1. Materiales.....   | 19 |
| 3.2. EVALUACION DE GERMOPLASMA DE TOMATE<br>RESISTENTE A INFECCIONES VIRALES.....  | 20 |
| 3.2.1. Características del germoplasma.....  | 20 |
| 3.2.2. Ubicación del ensayo.....   | 20 |
| 3.2.3. Descripción del ensayo experimental.....                                    | 20 |
| 3.2.4. Unidad experimental.....  | 20 |
| 3.2.4.1. Muestreo aleatorio.....   | 20 |
| 3.2.4.2. Muestreo por síntomas.....  | 21 |
| 3.2.5. Variables.....  | 21 |
| 3.2.5.1. Campo.....  | 21 |
| 3.2.5.2. Laboratorio.....  | 21 |
| 3.2.6. Manejo del cultivo.....   | 21 |
| 3.2.7. Muestreos en campo.....   | 22 |
| 3.2.7.1. Mosca blanca.....   | 22 |
| 3.2.7.2. Tejido vegetal.....   | 22 |
| 3.2.8. Equipo y material de laboratorio.....                                       | 22 |
| 3.2.9. Método de extracción de ADN.....  | 23 |
| 3.2.10. Método de amplificación de ADN.....  | 23 |
| 3.2.11. Método de electroforesis.....  | 24 |
| 3.2.12. Análisis estadístico.....  | 25 |
| 3.3. EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA DE FRIJOL   |    |

|   |    |
|---|----|
| RESISTENTE A INFECCIONES VIRALES.....                           | 25 |
| 3.3.1. Características del germoplasma.....                     | 25 |
| 3.3.2. Ubicación del ensayo.....                                | 26 |
| 3.3.3. Descripción del ensayo experimental.....                 | 26 |
| 3.3.4. Unidad experimental.....                                 | 26 |
| 3.3.4.1. Muestreo aleatorio.....                                | 26 |
| 3.3.4.2. Muestreo por síntomas.....                             | 27 |
| 3.3.5. Variables.....   | 27 |
| 3.3.5.1. Campo.....   | 27 |
| 3.3.5.2. Laboratorio.....                                       | 27 |
| 3.3.6. Manejo del cultivo.....                                  | 27 |
| 3.3.7. Muestreos de campo.....                                  | 28 |
| 3.3.7.1. Mosca blanca.....                                      | 28 |
| 3.3.7.2. Tejido vegetal.....                                    | 28 |
| 3.3.8. Equipo y material de laboratorio.....                    | 28 |
| 3.3.9. Método de extracción y purificación de ADN.....          | 28 |
| 3.3.10. Método de amplificación de ADN.....                     | 28 |
| 3.3.11. Método de electroforesis.....                           | 29 |
| 3.3.12. Análisis estadístico.....                               | 29 |
| <br>  |    |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSION.....                                  | 30 |
| 4.1. DINAMICA POBLACIONAL DE MOSCA BLANCA<br>EN ZAMORANO.....   | 30 |
| 4.2. TOMATE.....  | 31 |
| 4.2.1. Muestreos semanales de adultos de mosca blanca.....      | 32 |
| 4.2.2. Incidencia y severidad de infección viral en tomate..... | 33 |
| 4.2.2.1. ANDEVA.....  | 34 |
| 4.2.2.2. Prueba Duncan para separación de medias.....           | 34 |
| 4.2.3. Rendimiento de tomate.....                               | 35 |
| 4.2.3.1. ANDEVA.....  | 35 |
| 4.2.3.2. Prueba Duncan para separación de medias.....           | 35 |
| 4.2.4. Sólidos totales en tomate.....                           | 36 |
| 4.2.4.1. ANDEVA.....  | 36 |
| 4.2.4.2. Prueba Duncan para separación de medias.....           | 36 |
| 4.2.5. Muestreos de tejido foliar para el análisis por PCR..... | 37 |
| 4.2.5.1. Muestreo aleatorio.....                                | 37 |
| 4.2.5.2. Muestreo por síntomas.....                             | 39 |
| 4.3. FRIJOL.....  | 40 |
| 4.3.1. Muestreos semanales de adultos de mosca blanca.....      | 40 |
| 4.3.3. Incidencia y severidad de infección viral en frijol..... | 40 |
| 4.3.3.1. ANDEVA.....  | 41 |
| 4.3.3.2. Prueba Duncan para separación de medias.....           | 41 |
| 4.3.4. Rendimiento de frijol.....                               | 42 |
| 4.3.4.1. ANDEVA.....  | 42 |
| 4.3.4.2. Prueba Duncan para separación de medias.....           | 42 |
| 4.3.5. Muestreos de tejido foliar para análisis por PCR.....    | 43 |
| 4.3.5.1. Muestreo aleatorio.....                                | 43 |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 4.3.5.2. Muestreo por síntomas..... | 44 |
| 5. <b>CONCLUSIONES</b> .....        | 46 |
| 6. <b>RECOMENDACIONES</b> .....     | 48 |
| 7. <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....        | 50 |
| 8. <b>ANEXOS</b> .....              | 54 |

## INDICE DE CUADROS

## Cuadro

|    |  |    |
|----|--|----|
| 1. | Características y relaciones de los subgrupos de Geminivirus.....  | 9  |
| 2. | Principales enfermedades virales del cultivo de tomate.....  | 12 |
| 3. | Principales enfermedades virales que atacan al cultivo del frijol común, sus vectores y síntomas.....  | 16 |
| 4. | "Primers" proporcionados por la U. de Wisconsin para la detección de geminivirus, TYLCV y VMDF y controles positivos y negativos utilizados..... | 23 |
| 5. | Principales características de las variedades de frijol cultivadas en Honduras.....  | 26 |
| 6. | Incidencia y severidad de infección viral de cinco variedades de tomate.....   | 34 |
| 7. | Plantas positivas a geminivirus ("primers" cpc715 y repv 1978) y a TYLCV ("primers" v21 y c287) en cinco variedades de tomate...                 | 37 |
| 8. | Incidencia y severidad de infección viral en seis variedades de frijol común.....  | 41 |
| 9. | Plantas positivas a geminivirus ("primers" cpc715 y repv1978) y a VMDF ("primers" 47 y 1068) en seis variedades de frijol común...               | 43 |

## INDICE DE FIGURAS

## Figura

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.  | Dinámica poblacional de mosca blanca en Zamorano de Enero 1997 a Diciembre 1999.....   | 30 |
| 2.  | Precipitación total y temperatura promedio mensual desde Enero de 1996 hasta Diciembre de 1999 en Zamorano.....                                    | 31 |
| 3.  | Muestreo semanal de adultos de mosca blanca en cinco variedades de tomate.....   | 32 |
| 4.  | Separación de medias por la Prueba Duncan del índice de infección viral de cinco variedades de tomate.....   | 35 |
| 5.  | Separación de medias mediante la Prueba Duncan para valores de rendimiento en kg/ha para cinco variedades de tomate.....                           | 36 |
| 6.  | Separación de medias mediante la Prueba Duncan para valores de sólidos totales de frutos de cinco variedades de tomate.....                        | 37 |
| 7.  | Resultados de PCR para geminivirus ("primers" cpc715 y repv1978) en plantas de tomate (muestreo aleatorio).....                                    | 38 |
| 8.  | Resultados de PCR par TYLCV ("primers" v21 y c287).....  | 39 |
| 9.  | Muestreos semanales de adultos de mosca blanca en seis variedades de frijol con datos sin transformar.....   | 40 |
| 10. | Separación de medias mediante la Prueba Duncan para valores transformados de incidencia de infección viral de seis variedades de frijol común..... | 42 |
| 11. | Separación de medias mediante la Prueba Duncan para valores de rendimiento de seis variedades de frijol común.....                                 | 43 |
| 12. | Resultados de PCR para geminivirus ("primers" cpc715 y repv 1978) en frijol (muestreo individual por síntomas).....                                | 44 |

**INDICE DE ANEXOS**

## Anexo

1. Protocolo de extracción de ADN de Doyle & Doyle..... 55
2. Detalle de síntomas y resultados de PCR para muestras de tejido foliar de tomate y frijol..... 57

## 1. INTRODUCCIÓN

La mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en su papel como vector de gemínivirus (Geminiviridae) produce un daño directo e indirecto que ha crecido durante los últimos años hasta convertirse en el factor limitante más importante en la producción de varios cultivos hortícolas y textiles de Honduras, especialmente en tomate, chile, frijol y algodón (Sponagel y Fúnez, 1994). En los últimos años, la producción de estos cultivos agrícolas y hortícolas se ha visto gravemente amenazada por la presencia de mosca blanca como insecto vector en el complejo con gemínivirus.

La importancia del problema, además del factor productivo de estos cultivos, radica en el peligro ya existente que la mosca blanca por su plasticidad genética y capacidad de adaptación a ecosistemas cada vez más diversos y plantas hospederas antes no reportadas, siga extendiéndose a otros cultivos, además de que se establezca como portador de nuevas enfermedades de índole viral, aún más complejas (Sponagel y Fúnez, 1994).

En las zonas productoras importantes de cultivos hortícolas y agronómicos en Honduras ya se ha observado la dificultad en el manejo que presenta el complejo mosca blanca-gemínivirus, debido al escaso conocimiento o errores que se tienen sobre las características de la infección causada por un patógeno de etiología viral. Este problema ha comprometido desde hace ya varias décadas la estabilidad ambiental, salud humana y rentabilidad económica, al emplearse el manejo químico del vector como única solución efectiva a corto plazo.

Por otro lado, la tendencia actual de apertura de mercados y libre comercio y su implicación en el movimiento de material de una región a otra, además de los factores naturales abióticos imposibles de manipular, han causado la introducción de enfermedades de tipo viral a regiones donde antes no habían sido reportadas. Esto ha llevado a que actualmente la responsabilidad de instituciones educativas y gubernamentales radique en adquirir una posición centinela para determinar la presencia de nuevos patógenos virales que puedan comprometer la producción de una región, y así mismo, la responsabilidad de ofrecer alternativas de manejo que sean amigables, rentables y efectivas.

Es por esto que instituciones internacionales, gubernamentales y privadas, han enfocado sus esfuerzos al desarrollo de germoplasma resistente a gemínivirus como una alternativa de fácil adopción y promisoria para el manejo de este complejo problema fitopatológico. Tal ha sido el caso del Programa de Investigación en Frijol (PIF) de la Escuela Agrícola Panamericana y "The Volcani Center" del Ministerio de Agricultura de Israel en el

desarrollo de variedades resistentes a los geminivirus más importantes en los cultivos de frijol y tomate, respectivamente.

En conjunto con Zamorano, científicos del Programa de Apoyo para la Colaboración en Investigación en Frijol/Caupí, (Bean/Cowpea CRSP, siglas en inglés) desde hace algunos años han investigado la incidencia de geminivirus en los valles de Francisco Morazán y Comayagua, Honduras. A través de este programa se ha conducido investigación para determinar la presencia de geminivirus con relación a otras enfermedades virales en frijol, tomate y otros cultivos hortícolas, y malezas en Honduras y Costa Rica. Los últimos resultados demuestran que aproximadamente un 50% de las muestras con síntomas de infección viral resultaron positivas a geminivirus mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) (Doyle *et al.*, 1999).

Con relación a lo anterior, el 50% de las muestras restantes con sintomatología viral pueden ser atribuidas a la infección por otros virus no transmitidos por mosca blanca, deficiencias nutricionales, toxicidad u otras causas. Este amplio rango de enfermedades de etiología viral, localmente mal llamado como "virosis" son erróneamente atribuidos a geminivirus transmitidos por mosca blanca. Esto trae como consecuencia que recursos sean mal gastados en controlar químicamente este insecto, con beneficios cuestionables (Doyle *et al.*, 1999).

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivos generales

1. Evaluar germoplasma de tomate y frijol resistente a infecciones causadas por geminivirus como alternativa de manejo para el problema de este complejo viral.
2. Determinar la presencia del Virus de las hojas amarillas en cuchara del tomate ("Tomate Yellow Leaf Curl Virus", TYLCV) en Honduras.

### 1.2.2. Objetivos específicos

1. Proveer información biológica y técnica del germoplasma evaluado en tomate para su uso potencial a nivel comercial.
2. Determinar la presencia de ADN viral en el germoplasma resistente a infecciones por geminivirus para entender los mecanismos de resistencia y proveer información útil para la labor de los fitomejoradores.
3. Documentar la relación de la presencia de infección por geminivirus y del insecto vector (*Bemisia tabaci*) mediante muestreos en el área de producción de Zamorano para entender la epidemiología del complejo.

4. Aportar información para el entendimiento de la biología y ecología compleja de los geminivirus como agentes fitopatógenos en los cultivos de tomate y frijol.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. MOSCA BLANCA

#### 2.1.1. Taxonomía

La mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius), es un insecto que pertenece al Orden Homóptera, Familia Aleyrodidae (Sponagel y Fúnez, 1994). Existen unas 1200 especies de la familia Aleyrodidae constituida por dos subfamilias Aleurodicinae y Aleurodinae, siendo esta última más evolucionada y con mayor importancia económica. En América Central y El Caribe existen por lo menos 30 especies de Aleyrodidae, siendo las más importantes en términos económicos: *B. tabaci* (Genn.) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Caballero, 1996) y actualmente *Bemisia argentifolii* (Bellows & Perring) (Hiebert *et al.*, 1996) identificado como biotipo B de *B. tabaci*.

#### 2.1.2. Biología

La naturaleza de la mosca blanca es la de un insecto picador-chupador. Se alimenta succionando la savia al introducir una proboscis, que se encuentra en el estilete, en el tejido foliar del envés de la hoja. Al mismo tiempo, en dirección contraria, la mosca blanca inyecta saliva hacia el tejido foliar con el fin de que un complejo enzimático suavice la células para facilitar la succión. Tiene una metamorfosis incompleta compuesta de seis estadios que son: huevo, gateador, dos ninfas sésiles, pupa y adulto, todos éstos viviendo en el envés de las hojas de las plantas hospederas. Su reproducción puede ser de dos tipos: sexual y asexual por partenogénesis. En el primer caso, la progenie puede ser machos o hembras; en cambio, en el segundo caso, solo nacen crías hembras (Sponagel y Fúnez, 1994). Esta condición reproductiva ha dado ventajas a la proliferación de poblaciones de mosca blanca a niveles inaceptables en muchos casos, y así su condición de vector de virus.

La duración de su ciclo de vida es determinado por el sexo del insecto. Las hembras pueden vivir un promedio de 13 días, con un rango de 9 a 17 días. Los machos tienen un ciclo de vida de 62 días en promedio, con un rango de 38 a 74 días. Esta condición da un total de 11 a 12 generaciones por año en la región tropical. A temperaturas menores de 17°C la mosca blanca no puede cumplir su ciclo de desarrollo (Sponagel y Fúnez, 1994).

El gateador es el único estadio inmaduro móvil. Los siguientes dos estadios larvales y el pupal son sésiles. El adulto es bastante móvil cuando es disturbado y puede moverse de

una planta a otra mediante el vuelo, aunque los desplazamientos mayores son ayudados por efecto del viento.

Todos los estadios larvales y el adulto se alimentan de la savia del hospedero, a excepción del estadio pupal que no se alimenta. Mientras los estadios larvales se alimentan de la savia de las hojas bajas de la planta, dada su limitada capacidad de movimiento, los adultos inmediatamente después de emerger migran hacia la parte superior de la planta para alimentarse de tejido joven, principalmente (Sponagel y Fúncz, 1994).

El rango de plantas hospederas es de al menos 500 especies de plantas comestibles y no comestibles (Brown, 1993). Las principales familias hospederas son (en orden de número de especies hospedantes por familia): Leguminosae, Solanaceae, Compositae, Euphorbiaceae, Rutaceae, Malvaceae, Cucurbitaceae, entre otras (Caballero, 1993). *B. tabaci* es una plaga muy extendida en los cultivos de algodón, tabaco, frijol y tomate bajo riego en Centroamérica, desde su introducción en 1961-62 durante el ciclo algodnero en El Salvador (CATIE, 1990).

### 2.1.3. Morfología

Los huevecillos de mosca blanca son elípticos y miden de 0.2 - 0.3 mm de largo (Sponagel y Fúncz, 1994). Son ovipositados gregariamente en el envés de las hojas inferiores de la planta hospedera, siguiendo un patrón elíptico <sup>1</sup>. Las ninfas son de color amarillo pálido, de forma elíptica y alargada y están rodeadas de filamentos de cera que parecen "setas" (Caballero, 1996). El adulto es de color blanco y mide de 1 - 2 mm, siendo los machos más pequeños que las hembras (Sponagel y Fúncz, 1994). Las alas en reposo están dispuestas en forma de "techo" sobre el abdomen (Caballero, 1996).

### 2.1.4. Distribución geográfica

*B. tabaci* es presumiblemente originaria del Oriente o Pakistán, y ha sido dispersada hacia otros lugares básicamente por transporte humano de material vegetativo (Brown y Bird, 1992). Actualmente se encuentra distribuida desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina, incluyendo El Caribe. También ocasiona problemas en Africa, Asia, Europa y Australia (Hilje, 1996). Aunque la mosca blanca tienen una distribución cosmopolita, un 63% de las especies se encuentran en las zonas tropicales (Caballero, 1993).

<sup>1</sup> Jaco, A. 1999, comm. pers. Zamorano, Honduras.

### 2.1.5. Daño que ocasiona a los hospederos

La mosca blanca puede ocasionar dos tipos de daño: directo e indirecto.

2.1.5.1. Daño directo. 1) Succión de savia por parte de adultos e inmaduros. Al succionar elementos nutritivos de la planta se producen trastornos en el desarrollo del hospedero causando disminuciones en el rendimiento y en la calidad de los frutos obtenidos. Estos daños pueden ascender a pérdidas mayores al 50% (Sponagel y Fúnez, 1994); y 2) Inyección de saliva de los inmaduros y adultos durante la alimentación. Esta sustancia produce manchas cloróticas sobre las hojas del hospedero. En condiciones de alta presión de mosca blanca pueden causar un amarillamiento irregular del tejido foliar provocando marchitamiento, caída de hojas y brotes (Sponagel y Fúnez, 1994).

2.1.5.2. Daño indirecto. Todos los estadios de la mosca blanca producen una mielecilla como mecanismo excretor. Esta sustancia al cubrir la superficie del tejido vegetal sirve de medio de crecimiento para diversos hongos causantes de fumagina. La fumagina causa una disminución del área fotosintética disminuyendo así los rendimientos y la calidad de los frutos cosechados (Sponagel y Fúnez, 1994). *Bemisia tabaci* es el único vector conocido de Geminivirus (Sponagel y Fúnez, 1994) y es probablemente el grupo de virus de mayor crecimiento (Xiong, 2000).

### 2.1.6. Complejidad del problema

El poco entendimiento sobre la biología, ecología y epidemiología de este reino de patógenos, básicamente a nivel empírico y sintomatológico de identificación ha llevado a que a la amplia gama genética de virus existentes y varios problemas fisiológicos de la planta sean incluidos bajo una sola identificación común: "vírosis". Poco a poco, al esclarecerse algunas dudas sobre este complejo grupo de patógenos se han llegado a identificar algunos virus específicos y a determinar sus vectores. Tal es el caso de los geminivirus y su complejo con la mosca blanca. Lamentablemente, así como al grupo de geminivirus y otros pocos virus estudiados, muchas otras enfermedades de etiología viral o no viral han sido atribuidas a estos grupos sin serlo.

El manejo fitosanitario de la mosca blanca se ha vuelto un tema complejo y hasta sobre estimado por el amplio rango de enfermedades virales desconocidas que se le adjudican a este vector. La dificultad del manejo de este insecto, más aún cuando está relacionado al complejo con geminivirus, se debe a las siguientes causas:

2.1.6.1. Plasticidad genética. Brown y Bird (1992) mencionan que se ha comprobado la presencia de por lo menos cuatro distintas razas o biotipos de *B. tabaci* en América del Norte y El Caribe; adicionalmente, Hülje (1996) argumenta que en la misma zona geográfica existen siete biotipos diferentes. Los dos principales biotipos son el A,

considerado a *B. tabaci*, y el B, considerado como una nueva especie, *B. argentifolii*; siendo este último más fecundo y polífago que el biotipo A. Esta diferenciación se basa en la especificidad de la utilización de diversos hospederos para su alimentación y reproducción. Brown (1999) afirma que el incremento en importancia económica de los begomovirus como agentes patógenos, se atribuye a la expansión de la agricultura bajo riego y a la invasión de la especie de mosca blanca *Bemisia tabaci* biotipo B originaria del Viejo Mundo y de características polífagas. Otra prueba de la amplia plasticidad genética es la gran variación morfológica de las ninfas (Hilje, 1996), al punto de que las claves de identificación de especies de mosca blanca se basan en la morfología del estadio ninfal (Brown y Bird, 1992). Esta amplia variabilidad genética ha provocado un gran problema en el manejo de este insecto, rápida adquisición de resistencia a insecticidas y además su fácil adaptación a nuevas zonas geográficas (Hilje, 1996). Brown (1993) afirma que inicialmente el rango de adaptación de la mosca blanca se localizaba en ecosistemas entre los 30° norte y sur, pero recientemente, este ha sido ampliado hacia regiones del neotrópico y zonas templadas que antes no eran consideradas.

**2.1.6.2. Condición altamente polífaga.** El número de especies hospederas de *B. tabaci* asciende a 506, concentradas en 74 familias entre mono y dicotiledóneas (Brown y Bird, 1992). En Mesoamérica se hospeda en por lo menos 71 especies, de las cuales 17 son cultivos y 54 plantas silvestres (Hilje, 1996).

**2.1.6.3. Vector de geminivirus.** Entre las 1100 especies de mosca blanca en el mundo, solo tres son conocidas como vectores de virus fitopatógenos (Sponagel y Fúnez, 1994). Brown y Bird (1992) citan que *B. tabaci* es actualmente considerada como el vector de virus fitopatógenos más importante y común y el único vector conocido de geminivirus, de los que hay reportados mundialmente al menos 43 (Hilje, 1996). Dependiendo del cultivo, la estación y la densidad poblacional del insecto, las pérdidas en los cultivos varían de 20 - 100% (Brown y Bird, 1992). La transmisión de geminivirus es de tipo persistente-circulativo (Brown y Bird, 1992), lo que significa que el virus adquirido por el insecto durante su alimentación circula dentro de su cuerpo a través del intestino y la hemolinfa hasta llegar a las glándulas salivales (Sponagel y Fúnez, 1994), para volver a ser inyectado en otra planta hospedera. *B. tabaci* es capaz de transmitir el geminivirus a las 4 - 10 horas después de la adquisición del virus y puede hacerlo por un tiempo de 5 - 20 días con una disminución gradual en la eficiencia de transmisión. Los virus transmitidos por mosca blanca pueden presentarse solos o en infecciones múltiples (Brown y Bird, 1992) limitando así su pronta identificación. Brown (1999) comenta que el vector del biotipo B es capaz de desplazar al biotipo A que habita en el Nuevo Mundo, y que probablemente también sería un vector más efectivo en la transmisión de begomovirus.

2.1.6.4. Alta prolificidad. Durante la estación seca, bajo altas temperaturas, y preferiblemente en ecosistemas bajo irrigación la población de mosca blanca puede alcanzar niveles desmesurados y contribuir así a la diseminación de geminivirus. La proporción de sexos va de 1-2 hembras : 1 macho en el campo (Sponagel y Fúnez, 1994). Bajo condiciones favorables en un año se pueden completar de 11 - 15 generaciones y las hembras fértiles pueden depositar de 100 - 300 huevecillos en un periodo de vida de 3 - 6 semanas (Brown y Bird, 1992). Anteriormente se había mencionado el fenómeno de arrenotoquía que sufren las hembras de mosca blanca bajo la condición de falta de machos para su fertilización, lo que conduce a que las hembras se reproduzcan asexualmente por partenogénesis originando crías machos.

## 2.2. GEMINIVIRUS

El complejo *B. tabaci*-virus se conoce y se estudia desde 1930 (Sponagel y Fúnez, 1994). La primera enfermedad ocasionada por geminivirus fue diagnosticada en Africa en el cultivo de maíz; rayado del maíz (o "Maize Streak Virus", MSV), cuyos vectores fueron identificados como *Cicadulina mobila*, *C. storey* y *C. bipunctella zae* (Bock, 1974), y pertenece al género *Mastrevirus*. En 1975, en Brasil se diagnosticó el primer geminivirus transmitido por mosca blanca ocasionando el mosaico dorado del tomate (Lastra, 1993). Recientemente se han detectado enfermedades causadas por geminivirus en América y El Caribe, considerado como el patógeno transmitido por mosca blanca más numeroso y diseminado (Brown y Bird, 1992).

### 2.2.1. Taxonomía

Según la clasificación del Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV, siglas en inglés), de Briddon y Markham (1995), los geminivirus pertenecen a la familia Geminiviridae que consta de tres géneros: *Mastrevirus* (Subgrupo I), *Curtovirus* (Subgrupo II) y *Begomovirus* (Subgrupo III).

### 2.2.2. Plantas hospederas de geminivirus

Algunas especies de malezas también son hospederas de mosca blanca, y posiblemente hospederas de geminivirus, constituyendo la fuente de inóculo del patógeno cuando las poblaciones de mosca blanca son bajas. Entre estas malezas, las más importantes reportadas en Puerto Rico por Brown y Bird (1992) son *Jatropha gossypifolia* (L.), *Macroptilium lathyroides* (L.), *Merremia quinquefolia* (L.), *Poinsettia heterophylla* (L.), *Rhynchosia minima* (DC.) y *Sida carpinifolia* (L.). Durante la investigación del proyecto Bean/Cowpea-CRSP en Honduras, se identificaron a *Nicandra physalodes*, *Abutilon* spp., *Sida acuta*, *Euphorbia heterophylla*, *Malvastrum coromandelianum* y *Wssadula excelsior*, como malezas hospederas de geminivirus (Doyle *et al.*, 1999).

### 2.2.3. Morfología

El virión de geminivirus está formado de dos partículas icosaédricas de forma circular unidas por una cara, compuestas por una cadena simple (ss) de ADN y una proteína que forma la cubierta. El genoma está compuesto por una o dos moléculas de ADN, mono o bipartitos (Ramírez y Rivera-Bustamante, 1996). El genoma de los monopartitos está compuesta por 2.6 kb (2600 pares de bases nitrogenadas) y son transmitidos por la mosca blanca; los bipartitos se forman de 5.2 kb y son transmitidos por saltahojas (Brown y Bird, 1992). Según Ramírez y Rivera-Bustamante (1996), el genoma de los monopartitos tiene 2900 pares de bases nitrogenadas (pb) y los bipartitos con 2600 pb en cada molécula. Las moléculas de los bipartitos tienen distinta constitución, a excepción de una zona llamada "región común" compuesta de 200 pb que difiere de un virus a otro.

Cuadro 1. Características y relaciones de los subgrupos de Geminivirus.

|                        | Subgrupo I                         | Subgrupo II  | Subgrupo III                                 |
|------------------------|------------------------------------|--|--|
| Número de ss ADN       | 1                                  | 1  | 2  |
| Insecto vector         | Saltahojas                         | Saltahojas   | Mosca blanca                                 |
| Rango de hospederos    | Monocotiledóneas                   | Dicotiledóneas   | Dicotiledóneas                               |
| Miembro característico | "Virus del rayado del maíz" (MSV)* | "Virus de la cabeza arpillada de la remolacha" (BCTV)* | "Virus del mosaico dorado del frijol" (VMDF) |

\* Siglas en inglés

Fuente: Xiong, Z. (2000).

Dos virus recientemente reportados el Virus de las hojas amarillas en cuchara del tomate ("Tomato yellow leaf curl virus", TYLCV) y el Virus de las hojas en cuchara del tomate ("Tomato leaf curl virus") que aparentemente se sitúan entre el subgrupo II y III. Los dos tienen ss ADN, se hospedan en dicotiledóneas y son transmitidas por mosca blanca (Xiong, 2000).

### 2.2.4. Sintomatología

Aunque la sintomatología de las plantas hospederas de patógenos virales es muy variable y poco confiable para asegurar un diagnóstico, existen síntomas básicos debidos a la infección de geminivirus; el amarillamiento general de la planta afectada, enanismo marcado y deformación o ampollamiento en las hojas.

### 2.2.5. Detección

La detección de geminivirus es compleja dado que son partículas en su mayoría no transmisibles por medios mecánicos, dificultando así el aislamiento bajo condiciones controladas. Además, el diagnóstico por sintomatología no es un criterio que se utiliza en virus debido a la gran variabilidad de síntomas que se presentan (Lastra, 1993). Sin embargo, existen diversos métodos de diagnóstico:

2.2.5.1. Detección de la proteína viral. Basada en el uso de anticuerpos mediante la técnica del Ensayo de inmunoadsorcencia ligado a una enzima ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", ELISA). Tiene alta sensibilidad de detección de la proteína y bajo costo, pero es raramente usada en la detección de geminivirus porque las partículas tienen una baja capacidad antigénica, lo que no provoca una reacción inmunológica fuerte en el animal inoculado y así los niveles de anticuerpos obtenidos son bajos (Ramírez y Rivera-Bustamante, 1996).

2.2.5.2. Detección del ADN viral. Es posible visualizar el ADN mediante su tinción con bromuro de etidio y su posterior exposición a rayos UV. El material utilizado para la visualización es ADN previamente amplificado por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa ("Polymerase Chain Reaction", PCR) con "primers" específicos para aumentar la concentración del ADN viral encontrado en el tejido infectado.

2.2.5.3. Hibridación molecular. El proceso sirve para unir dos cadenas simples complementarias de ácido nucleico ya sea ADN o ARN, y obtener productos como ADN/ADN, ADN/ARN o ARN/ADN. La molécula híbrida marcada con un compuesto radioactivo o con una enzima puede detectarse respectivamente por auto-radiografía o por hidrólisis de algún sustrato (Ramírez y Rivera-Bustamante, 1996).

2.2.5.4. Bioensayos de transmisión. La transmisión utilizando un vector como mosca blanca ha sido muy eficiente bajo condiciones controladas del ambiente y de la población del vector (Lastra, 1993).

2.2.5.5. Observación de inclusiones virales. Utilizando un microscopio de luz se puede lograr observar las inclusiones virales de los geminivirus. Para esto se necesita tejido proveniente de la parte apical de la planta sintomática (Lastra, 1993). La desventaja del método está en la destreza y capacidad de reconocimiento de las inclusiones virales por parte del técnico para no confundir con otros artefactos.

### 2.2.6. Manejo del complejo mosca blanca-geminivirus

Antes de iniciar cualquier acción de manejo contra mosca blanca como posible vector de geminivirus, es necesario descartar la posibilidad de infección de otros virus transmitidos por otro tipo de vectores que no sean *B. tabaci*, salvo en el caso que se trate de infecciones mixtas. Además, cabe recalcar que muchas alteraciones fisiológicas como efectos de toxicidad, deficiencias nutricionales y condiciones abióticas en ocasiones pueden aparecer visualmente como síntomas producidos por infecciones virales.

El manejo del geminivirus se puede dar de dos modos: manejando la población de mosca blanca como insecto-vector mediante diversas prácticas y compatibles y/o utilizando germoplasma resistente o tolerante a la presencia del patógeno.

Convencionalmente el manejo de poblaciones de mosca blanca se ha basado casi exclusivamente en el uso aplicaciones de insecticidas sistémicos. Sin embargo, es necesario desarrollar otras tácticas de manejo pues el control exclusivo del vector, mosca blanca, es inadecuado para el control del virus y además el insecto ya ha desarrollado resistencia a plaguicidas (Hiebert *et al.* 1996). Hay que tomar en cuenta el estado del equipo de aplicación en el caso del manejo químico ya que requiere una cobertura total del follaje de la planta hospedera del insecto, dadas las características biológicas de los instares inmaduros y la gran movilidad del estadio adulto.

El manejo integrado de plagas (MIP) es una estrategia que ha tenido buenos resultados en manejar el complejo mosca blanca-geminivirus y otras enfermedades de etiología viral. El MIP consiste en la incorporación de prácticas compatibles de tipo cultural, biológico, mecánico, sin excluir además el uso sostenible y racional de agroquímicos basado en la determinación de niveles de daño económico. Para el caso del complejo mosca blanca-geminivirus algunas prácticas MIP están las prácticas culturales (Sponagel y Fúnez, 1994) que incluyen la el uso de variedades resistentes, tolerantes o de ciclo corto; incorporación de rastrojos de cultivos anteriores con el fin de romper el ciclo de la mosca blanca; la eliminación de plantas hospederas alternas dentro y fuera de la plantación; el inicio de la siembra en la última posición contra el viento considerando que la mosca blanca es una plaga de fácil traslado por las corrientes de aire; la siembra de alta densidad; la rotación con cultivos no hospederos de la mosca blanca; el establecimiento de barbechos; la planificación de siembras de acuerdo a las épocas de baja incidencia del vector; la uniformización de las fechas de siembra de acuerdo a las épocas de baja incidencia del vector a nivel de una región; y la siembra de cultivos atrayentes en los bordes y combate químico de la mosca blanca adulta.

Entre las prácticas mecánicas que recomienda el MIP, se tienen la siembra de barreras rompevientos; el raleo de plantas con síntomas de virosis en la plantación; el uso de trampas amarillas; y el uso de viveros protegidos y uso de mulch plástico de color blanco o plateado para cultivos hortícolas de alta rentabilidad.

En cuanto al empleo de enemigos naturales (Caballero, 1993), se incluye el uso de los parasitoides *Encarsia* spp., *Dirphys* spp., *Erectomocerus* spp. (Familia Aphelinidae), *Euderomphale* spp. (Familia Eulophidae) y *Amitus* spp. (Familia Platygasteridae) y los depredadores *Geocoris* sp. (Familia Lygaeidae), *Chrysoperla externa* (Familia Chrysopidae), *Cycloneda sanguinea*, *Delphastus* sp., *Nephaspis* sp., *Scymnus* sp. (Familia Coccinellidae), *Allograpta* sp. y *Toxomerus* sp. (Familia Syrphidae).

### 2.2.7. Uso de variedades resistentes

La resistencia varietal a infecciones virales es la única manera para el manejo de la enfermedad cuando no se puede combatir al vector (Salguero, 1993).

La resistencia genética permite a la variedad soportar el daño de la plaga. Lo ideal es tener resistencia al vector y al virus, o en el peor de los casos sólo a uno de los dos factores. La resistencia al vector se basa en características fenotípicas de la planta que no favorecen o no son atractivas (no preferencia) para el insecto vector (Salguero, 1993).

El desarrollo e implementación de variedades resistentes es un campo que debería enfatizarse como una solución promisoría en el manejo del complejo *B. tabaci*-geminivirus y su implementación dentro de programas MIP (Salguero, 1993).

## 2.3. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE ETIOLOGÍA VIRAL DEL TOMATE Y FRÍJOL

### 2.3.1. Tomate

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) está considerado entre los cultivos hortícolas en estado fresco y procesado más importantes. Esta planta es afectada por un sinnúmero de plagas insectiles, hongos, bacterias, virus e incluso un micoplasma (Blancard, 1992).

Cuadro 2. Principales enfermedades virales del cultivo de tomate

| AFIDOS                                 | VECTORES  |                                     |
|--|---|-------------------------------------|
|  | MOSCA BLANCA  | MEDIOS MECANICOS                    |
| "Y" de la Papa<br>(potyvirus)          | Amarillamiento de las hojas<br>en cuchara del tomate<br>(geminivirus) | Mosaico del tabaco<br>(tobamovirus) |
| Mosaico del pepino<br>(cucumovirus)    | Moteado del tomate<br>(geminivirus)                                   | "X" de la papa<br>(potexvirus)      |
| Mosaico de la alfalfa<br>(alfamovirus) |   |                                     |

Fuente: Blancard (1992), Spraytec (1999) y Brunt *et al.* (1996)

En estudios recientes efectuados por Nakhla *et al.* (1998), sobre geminivirus existentes en Honduras, se determinó mediante PCR la presencia de tres geminivirus el Acucharamiento Severo de la Hoja del Tomate ("Tomato Severe Leaf Curl Virus//Honduras" ToSLCV//HN, asociado a la filogenia de los Virus del Acucharamiento de la Hoja de la Calabaza, e idéntico a los geminivirus asociados a tomates y pepinos en Guatemala. Los otros dos geminivirus distintos que fueron identificados son el Virus del Moteado del Tomate-Honduras 1 ("Havana Tomato Virus" o "Tomato Mottle Virus-Honduras 1", ToMoV-HN1) y Virus del Moteado del Tomate-Honduras 2 ("Tomato Mottle Virus-Honduras 2", ToMoV-HN2) que pertenecen a la filogenia del Virus del Mosaico del Abutilón.

### 2.3.2. Virus de las hojas amarillas en cuchara del tomate (TYLCV)

2.3.2.1. Taxonomía. Este virus fitopatógeno pertenece a la familia Geminiviridae, género Bigeminivirus (Geminivirus). Existen varias cepas reportadas de TYLCV provenientes de países como China (TYLCV-CHI), España (TYLCV-SP) y Tailandia (TYLCV-TH) (Brown, 1997), e Israel (TYLCV-IS) (Anderson, 1998).

2.3.2.2. Origen y distribución actual. El origen del TYLCV se atribuye al Medio y Lejano Oriente, aunque según las cepas, el origen es específico para cada una de éstas (Brown, 1997). Este geminivirus fue descrito por primera vez en Israel en 1964 e identificado como TYLCV-IS hasta 1994 (Anderson, 1998) y es considerado como el factor limitante de producción de tomate en ese país desde 1930 (Polston *et al.*, 1994). La incidencia de TYLCV se ha incrementado considerablemente entre 1990 y 1996 (Czosnek y Laterrot, 1997).

El TYLCV afecta al cultivo del tomate en varios países de la Cuenca del Mediterráneo, incluyendo a Israel, Jordania, Líbano, Irak, Arabia Saudita, Turquía, Túnez, Nigeria, Senegal, Sudán, Tunisia, Egipto, Kuwait, Jamaica. Además se ha reportado en Cuba, República Dominicana y recientemente en Portugal, España y el estado de Florida, USA (Blancard, 1992; Brown, 1997; Anderson, 1998).

2.3.2.3. Hospederos. Asclepiadaceae, Compositae, Leguminosae-Papilionoidae, Mavaceae y Solanaceae son las familias de plantas que se han reportado con hospederos susceptibles al virus (Brunt *et al.*, 1997 b). Entre los hospederos naturales se encuentran *L. esculentum*, *Cynanchum acutum* y *Malva parviflora* (Brown, 1997). *Datura stramonium*, *Nicotiana glutinosa*, *N. benthamiana* y *Phaseolus vulgaris* son especies que también presentan síntomas de la enfermedad (Brunt *et al.*, 1997 b). Recientemente se ha determinado que el frijol común actúa como reservorio natural del TYLCV-IS que es la cepa del virus más fácilmente transmitida por mosca blanca; incluso, se ha visto que TYLCV-IS está desplazando a otras cepas de TYLCV (Sánchez-Campos *et al.*, 1999).

**2.3.2.4. Morfología.** Este virus consiste de un genoma de ADN de una simple cadena (ss) circular y monopartita. El genoma total mide unas 5,5 kb (Brunt *et al.*, 1997 b).

**2.3.2.5. Biología.** El nombre de TYLCV ha sido dado a varios geminivirus transmitidos por mosca blanca por lo que actualmente sólo son nombrados de esta manera a virus con alta homología al genoma del TYLCV-IS (Czosnek y Laterrot, 1997).

El insecto vector reportado de TYLCV es *Bemisia argentifolii* (Perring & Bellows), o biotipo B de mosca blanca, en estado adulto. El TYLCV infecta varios cultivos, pero solo ha sido reportado como problema en tomate (Polston *et al.*, 1994; Czosnek y Laterrot, 1997), aunque actualmente se conoce que el frijol común actúa como reservorio de TYLCV en estado natural (Sánchez-Campos *et al.*, 1999).

A diferencia de lo que anteriormente se pensaba de la relación mosca blanca-geminivirus y su transmisión netamente persistente-circulativa, recientes estudios, citados por Czosnek y Laterrot (1997), han demostrado que el TYLCV puede ser transmitido a los huevecillos de mosca blanca por lo menos dos generaciones. Esto indica que en ausencia de una planta hospedera del virus, la mosca blanca puede servir de reservorio del virus.

**2.3.2.6. Síntomas.** En las hojas, los síntomas de infección por TYLCV se presentan como márgenes cloróticos, enanismo, acucharamiento y engrosamiento del tejido produciendo rigidez. Los síntomas presentes en la planta en general son: enanismo y brotes terminales "arrepollados". En los frutos el virus produce bajo "cuajado" por la abscisión de flores como producto de la infección (Spraytec, 1999).

**2.3.2.7. Manejo.** El TYLCV puede tener un efecto devastador en el rendimiento del cultivo de tomate, especialmente cuando los síntomas se presentan en la etapa temprana de desarrollo. Los efectos pueden ser mitigados por la incorporación de prácticas culturales y químicas para asegurar una infección tardía al proteger las plantas del insecto vector (Stansly y Conner, 2000) sin dejar de lado al uso potencial de germoplasma resistente o tolerante.

Stansly y Conner (2000), realizaron un estudio con resultados promisorios para reducir el número de mosca blanca y así retardar el apareamiento de síntomas, obteniendo buenos resultados al utilizar el agroquímico imidacloprid y en con menor efecto el uso de mulch de aluminio.

### 2.3.3. Frijol

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las especies vegetales más susceptibles a enfermedades causadas por virus fitopatógenos. Se conocen más de 70 virus diferentes capaces de infectar a esta leguminosa. Hay reportados tres clases de insectos vectores de los principales virus que afectan al frijol: áfidos, crisomélidos y mosca blanca (CIAT, 1988).

Como se mencionó anteriormente, el frijol común en sí, actúa como reservorio natural de virus que afectan a otras especies de plantas como es el caso del TYLCV-IS (Sánchez-Campos *et al.*, 1999).

Cuadro 3. Principales virus que atacan al frijol común, sus vectores y síntomas.

| Virus                        | Vector                                      |   |  |
|------------------------------|---|---|--|
|                              | Afidos                                      | Crisomélidos  | Mosca Blanca   |
| Mosaico Común (potyvirus)    | Mosaico y necrosis sistémica ("raíz negra") |   |  |
| Mosaico Amarillo (potyvirus) | Amarillamiento, "raíz negra" según cepas    |   |  |
| Mosaico Sureño (sobemovirus) |   | Clorosis y deformación foliar leves                 |  |
| Mosaico Snavé (sobemovirus)  |   | Difíciles de apreciar                               |  |
| Mosaico Severo (comovirus)   |   | Deformación foliar y mosaico (verde claro y oscuro) |  |
| Mosaico rugoso (comovirus)   |   | Deformación foliar por arrugamiento severo          |  |
| Mosaico Dorado (geminivirus) |   |   | Amarillamiento intenso y generalizado y enanismo. Aborto de flores. Deformación de vainas. |
| Mosaico Enano (geminivirus)  |   |   | Clorosis irregular en hojas. Deformación foliar, vainas. Enanismo.                         |

Fuente: CIAT (1988).

Según Rosas (1998), el Virus del Mosaico Dorado del Frijol (VMDF) es la enfermedad que a corto plazo se ha convertido en uno de los factores de mayor importancia que afecta la producción de frijol en América Latina. Miklas *et al.* (1998), afirman que el VMDF es la enfermedad del frijol común más importante en las tierras bajas del trópico americano.

### 2.3.4. Virus del mosaico dorado del frijol (VMDF)

**2.3.4.1. Taxonomía.** Su nivel taxonómico llega al nivel de especie. Es un virus perteneciente al género *Begomovirus* (Geminivirus), familia Geminiviridae (Büschén-Osmond, 1998). Su nombre en inglés "Bean Golden Mosaic Virus", con sus siglas BGMV.

Existen tres cepas de este geminivirus reconocidas actualmente : la cepa BR, identificada en Brasil, PR reportada por primera vez en Puerto Rico y recientemente identificado en Honduras el VMDF tipo II nombrado y caracterizado por D.P. Maxwell como VMDF ("Bean Golden Yellow Mosaic Virus", BGYMV)<sup>2</sup> (Brown *et al.*, 1997).

**2.3.4.2. Origen y distribución actual.** La cepa VMDF-BR es originaria de Sur América, mientras el origen de VMDF-PR no ha sido identificado hasta el momento. La cepa BGYMV fue identificada por primera vez en Honduras.

El VMDF se encuentra a elevaciones menores de 1200 msnm, en las cuales las temperaturas son altas y las fuentes de inóculo y poblaciones del vector son más numerosas (Rosas, 1998). Actualmente el VMDF se extiende en la zonas geográficas de El Caribe y Centroamérica, abarcando a República Dominicana, Jamaica, Puerto Rico, Guatemala, Honduras, Nicaragua (Brown *et al.*, 1997), además de Brasil y Venezuela (Büschén-Osmond, 1998). Curiosamente, las cepas de Venezuela y Puerto Rico difieren en los análisis de ADN por la técnica de hibridación (Brunt *et al.*, 1998), lo que podría sugerir la identificación de una cepa no reportada anteriormente dada la baja homología con las cepas existentes.

**2.3.4.3. Morfología.** El virus está conformado por dos cubiertas de proteína (cápsides) gemelas, simétricas e icosaédricas (Büschén-Osmond, 1998), con un genoma consistente de ss ADN circular (Brunt *et al.*, 1997 a).

**2.3.4.4. Biología.** El VMDF es transmitido por *Bemisia tabaci* (Genn.) biotipo A. En el insecto vector, el virus se comporta de una manera circulativa-persistente, lo que indica que no puede transferirse a la descendencia del insecto. El VMDF no puede ser transmitido por contacto entre plantas infectadas, semilla o polen (Brunt *et al.*, 1997 a).

Los viriones (estructura unitaria) del VMDF pueden ser encontrados en las hojas, mesófilo, floema y tallos, además en el núcleo y nucleolo (Büschén-Osmond, 1998).

<sup>2</sup> Maxwell, D.P.; Nakhla, M. 1999. Development of DNA-based Detection Methods for Geminiviruses in Central America. Correspondencia escrita.

**2.3.4.5. Hospederos.** Los hospederos naturales del VMDF además del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) son *Phaseolus lunatus* y las malezas *Macroptilium lathyroides* y *Malvastrum coromandelianum*. Experimentalmente se han infectado hospederos no-naturales mostrando básicamente clorosis como síntomas de la presencia del virus (Brunt *et al.*, 1997).

Ídris *et al.* (1999) afirman que *Macroptilium lathyroides* (L.) es una maleza hospedera de begomovirus en América subtropical y que es considerada el reservorio del VMDF- PR para frijol.

**2.3.4.6. Síntomas.** Las plantas infectadas por el virus presentan un amarillamiento intenso y generalizado del follaje, además de distorsión generalizada en toda la planta y diferentes grados de enanismo. Espinoza (1996), estudió la sintomatología como respuesta a infecciones de VMDF en varias variedades de frijol y determinó que los síntomas típicos pueden aparecer o no según el germoplasma hospedero. Cuando se produce la infección en etapas tempranas de desarrollo el rendimiento se ve afectado por la baja producción de vainas debido al aborto de flores. Cuando la infección se produce en etapas de crecimiento avanzado se logra la producción de vainas pero presentan deformación severa y retraso general del período reproductivo (CLAT, 1988).

**2.3.4.7. Manejo.** La resistencia genética y la adopción de prácticas culturales son un método económico y de las pocas alternativas disponibles a pequeños agricultores que no pueden acceder al uso de agroquímicos para el manejo de la enfermedad, y que será la base para el manejo de *B. tabaci* y sus virus vectores incluyendo el VMDF (Bográn *et al.*, 1998).

Bográn *et al.* (1998) realizaron un experimento para determinar la efectividad de enemigos naturales nativos en Honduras para el control de mosca blanca en frijol utilizando una variedad resistente a VMDF Dorado (Doro 364), y una susceptible Catrachita. Encontraron que básicamente los dos parasitoides que ejercían un control natural del 8 - 37% (según la época de siembra) eran *Encarsia pergandiella* y *E. nigricephala*. Los investigadores aseguran que dada la distribución y abundancia de estos parasitoides pueden ser aprovechados como agentes potenciales de control biológico de *B. tabaci* en América Latina y el Sur de los Estados Unidos. Así mismo, pero en menor efectividad (3 a 13% de depredación según la época de siembra) encontraron la acción de *Coleomegilla maculata*, *Nabis* spp. y *Geocoris punctipes* como depredadores de *B. tabaci* en ambiente natural.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. DINÁMICA POBLACIONAL DE MOSCA BLANCA EN ZAMORANO

Para poder entender la epidemiología del complejo mosca blanca-geminivirus en la zona en donde se llevó a cabo este ensayo fue necesario estudiar la dinámica poblacional del insecto vector a través del tiempo para determinar las estaciones con mayor propensión a presentar infecciones causadas por geminivirus causantes de daño económicamente significativo.

Un estudio sobre la dinámica poblacional de *Bemisia tabaci* desde 1997 hasta la presente fecha fue realizado por la autora de este documento, Andrea Campaña y Jose L. Guamán con el objetivo de determinar el efecto sobre las poblaciones de mosca blanca que tuvo el Huracán "Mitch" que azotó a Honduras en noviembre de 1998. Se determinó la relación de las fluctuaciones poblacionales de este insecto con relación a temperatura y precipitación promedio mensual en Zamorano.

García (1999), mediante encuestas a pequeños productores en la Región del Yeguaré, Honduras, observó que la mayoría de agricultores opinaban que los principales plagas insectiles habían disminuido en su población después del Huracán "Mitch", en especial la mosca blanca, debido a las variación extrema de las condiciones climáticas (lluvia, temperatura y viento).

##### 3.1.1. Materiales

Datos de pluviometría y precipitación fueron proporcionados por la base meteorológica manejada por la Unidad de Maquinaria Agrícola de la Escuela Agrícola Panamericana. Los registros de muestreo de plagas llevados por la UPH sirvieron para obtener datos sobre niveles críticos de mosca blanca en Zona II y III de producción de hortalizas.

## **3.2. EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA DE TOMATE RESISTENTE A INFECCIONES VIRALES**

### **3.2.1. Características del germoplasma**

El germoplasma resistente a TYLCV fue desarrollado por la Organización de Investigación Agrícola del Instituto de Protección Vegetal "The Volcani Center", institución perteneciente al Ministerio de Agricultura de Israel. Las semillas de las líneas fueron desarrolladas por Moshe Lapidot y su equipo de investigación. La denominación de las líneas todavía en estado de evaluación es la siguiente: TY-197, TY-198, TY-8479, TY-8933. En experimentos anteriores en Guatemala, estas líneas demostraron un buen desempeño ante infecciones por geminivirus.

La variedad testigo, altamente susceptible a geminivirus, fue PETO 98 de la Casa Comercial "Petoseed".

### **3.2.2. Ubicación del ensayo**

El ensayo se llevó a cabo en la Zona III de la Unidad de Producción Hortícola (UPH) de Zamorano, Región del Yeguaré, Departamento de Francisco Morazán. Esta localidad está situada a 30 km al sudeste de Tegucigalpa, carretera a Danlí, Honduras, a una latitud de 14° N y longitud de 87° O, altitud de 800 msnm y temperatura promedio de 23°C.

### **3.2.3. Descripción del ensayo experimental**

El ensayo se desarrolló en un área total de 180 m<sup>2</sup>. La separación entre hileras fue de 1 m y entre plantas 0.25 m. Hubo un total de 20 parcelas con 22 plantas cada una. Se evaluaron cinco variedades de tomate, de las cuales cuatro eran variedades resistentes a TYLCV y una variedad testigo altamente susceptible a geminivirus, frecuentemente utilizada en la UPH y en las principales zonas tomateras de Honduras.

El diseño experimental consistió en un diseño incompleto al azar (DIA) con un mínimo de tres repeticiones por variedad hasta un máximo de cinco, dependiendo de la disponibilidad de plántulas de cada línea al momento del transplante.

### **3.2.4. Unidad experimental**

**3.2.4.1. Muestreo aleatorio.** La unidad experimental (UE) estuvo representada por una planta tomada al azar sintomática o no. Se tomaron seis plantas de cada línea independientemente de las parcelas donde se encontraron. Se determinó hacer el muestreo de esta manera dada la baja disponibilidad y estado de las plantas que

sobrevivieron al trasplante y a la alta incidencia de bacteriosis (*Pseudomonas solanacearum*) y el Mal del Tallo ( *Fusarium oxysporum*).

**3.2.4.2. Muestreo por síntomas.** En este caso una UE fue considerada como una planta individual con síntomas de infección viral. Se tomaron dos plantas de cada variedad independientemente del número de parcelas. Los síntomas fueron documentados por escrito y mediante fotografías.

### 3.2.5. Variables

**3.2.5.1. Campo.** Las variables medidas en el ensayo de campo fueron :

- Número de moscas blancas por planta mediante una toma de datos semanal partiendo desde una semana después del trasplante hasta la cosecha.
- Incidencia de infección viral a las cinco semanas post-trasplante expresada en porcentaje de plantas sintomáticas.
- Severidad de la infección viral a las cinco semanas post-trasplante expresada en porcentaje de plantas con infección alta, moderada o baja y plantas sanas o asintomáticas.
- Peso de frutos comerciales y no comerciales al momento de la cosecha (semana 9-14 post-trasplante) expresado en kilogramos.
- Porcentaje de sólidos totales de los frutos completamente maduros de cada cosecha.

**3.2.5.2. Laboratorio.** Mediante procesos de laboratorio para determinar la presencia de ADN viral se determinaron las siguientes variables :

- Número de plantas con presencia de ADN de geminivirus mediante las técnicas de PCR y electroforesis, utilizando los "primers" universales para geminivirus de la Universidad de Wisconsin cpc 715 y repv 1978.
- De las plantas que se determinaron positivas a los "primers" de geminivirus universal se hizo una prueba mediante PCR y electroforesis para detectar la presencia de ADN de TYLCV utilizando los "primers" para TYLCV de la Universidad de Wisconsin TYLCV v 21 y TYLCV c 187. Como control positivo de TYLCV se utilizó un aislamiento de Egipto proporcionado también por la U. de Wisconsin.

### 3.2.6. Manejo del cultivo

Las semillas fueron sembradas en invernadero 25 días antes del trasplante que tuvo lugar el día 31 de julio de 1999. La fertilización se realizó bajo riego por goteo a razón de 20 kg/ha de Urea tres veces por semana. El sistema de tutoreo se instaló tres semanas post-trasplante. Se aplicó Sevin (carbaryl) para control de insectos defoliadores. El control de malezas se hizo manualmente aproximadamente una vez cada dos semanas. La cosecha se inició a la novena semana post-trasplante y se extendió hasta la décimo cuarta semana. Se hicieron dos cosechas principales en las que se recolectaron los frutos

maduros y pintones de todas las líneas. En la tercera cosecha se extrajeron tanto frutos maduros como inmaduros.

### 3.2.7. Muestreos en campo

**3.2.7.1. Mosca blanca.** Para la realización del muestreo semanal de la población de mosca blanca, se tomó en cuenta las tres hojas superiores completamente desarrolladas de cinco plantas de tomate por parcela. Durante la primera etapa de desarrollo se muestreó la planta de tomate en su totalidad. Se contabilizó el número de moscas blancas en estado adulto posando sobre el envés de las hojas.

**3.2.7.2. Tejido vegetal.** La recolección del tejido vegetal ya sea para el caso del muestreo aleatorio o por síntomas de plantas individuales, se realizó mediante la obtención de material proveniente de los brotes terminales en crecimiento activo, fresco, tierno y sin daño por algún otro patógeno que no sea viral.

El muestreo aleatorio se realizó tres semanas post-transplante y el muestreo por síntomas de plantas específicas fue a la sexta semana y otro a la novena semana post-transplante efectuado sobre las mismas plantas.

El objetivo de tener dos tipos de muestreos de tejido vegetal fue poder identificar todos los diversos síntomas (en el muestreo individual por síntomas) y además poder determinar la proporción de plantas sintomáticas o no a enfermedades virales y la presencia de ADN viral en ellas (muestreo aleatorio).

### 3.2.8. Equipo y material de laboratorio

Para el proceso de extracción de ADN y su purificación se utilizó morteros y pistilos estériles, buffers de extracción CTAB y lavado, tubos eppendorf, micropipetas y microcentrífuga.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando las perlas de PCR (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.), conteniendo ~1.5 unidades de *Taq* polimerasa, 10 mM de Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de cada dNTP (bases nitrogenadas) y estabilizadores incluyendo ASB (albúmina de suero bovino). Se reconstituyeron en 24 μl de agua destilada estéril para obtener un volumen final de 25 o 26 μl (dependiendo del par de "primers" utilizado). Para cada muestra se utilizó la mitad del volumen de la mezcla de agua destilada estéril, "primers" y una perla de PCR.

Cuadro 4. "Primers" proporcionados por la U. de Wisconsin para la detección de geminivirus, TYLCV y VMDF y controles positivos y negativos utilizados.

|             | "Primers"              | Tamaño (pb) | $\mu$ l | C +                      |
|-------------|------------------------|-------------|---------|--------------------------|
| geminivirus | cpc 715 y repv 1978    | 1400        | 1       | chile (+)<br>Zamorano    |
| TYLCV       | TYLCV v21 y TYLCV c287 | 450         | 0.5     | aislamiento de<br>Egipto |
| VMDF        | v47 y c1068            | 300         | 0.5     | frijol (+)<br>Comayagua  |

pb: pares de bases nitrogenadas,  $\mu$ l: microlitros utilizados de cada primer, C +: control positivo

Nota: El control negativo en todos los casos fue una suspensión de una perla de PCR en 24  $\mu$ l de agua destilada estéril.

La amplificación del ADN fue realizada en un termociclador (Perkin Elmer 480). Para la visualización del ADN viral amplificado, en caso de estar presente, se realizó electroforesis utilizando un tanque de electroforesis (Hoefer HE 33), fuente de electricidad (Bio-Rad 1000/500) y un transiluminador de rayos ultravioleta.

Se utilizaron dos concentraciones de geles de agarosa al 1% (para visualización de ADN amplificado de geminivirus universal) y 1.5% (para visualización de ADN amplificado de TYLCV), según recomendaciones de la U. de Wisconsin.

### 3.2.9. Método de extracción y purificación de ADN

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN total (planta y viral) de Doyle & Doyle, (Anexo 1)

### 3.2.10. Método de amplificación de ADN

Para la amplificación del ADN viral deseado a partir del total de ADN (planta y viral) extraído previamente se utilizó el método de PCR. El principio del método es la réplica de una sección específica de ADN de un organismo mediante la repetición de ciclos de temperatura por tiempos determinados.

El proceso consta de tres fases que proveen las condiciones específicas para la amplificación del geminivirus. Éstas son (Hughes, 1999):

Inicialmente, se somete a una etapa llamada "hot start", la cual consiste en 1 ciclo a 94°C, por 3 minutos para que se lleve a cabo una desnaturalización o separación preliminar.

1. Fase de desnaturalización: 94°C durante 1 minuto. A esta temperatura la doble hélice de ADN se separa para formar dos cadenas simples.
2. Fase de ligamiento: 55°C durante 2 minutos. En esta etapa los "primers" derecho y reverso se adhieren a la región común de las cadenas de ADN en la posición 3' y 5' de los carbonos del azúcar de los nucleótidos.
3. Fase de extensión: 72°C por 2 minutos. A esta temperatura la Taq polimerasa trabaja mejor sintetizando ADN. Se hace una copia completa del ADN meta (viral) en dirección 3' o 5' dependiendo del "primer".

Existe un ciclo de extensión adicional de 4 minutos a 72°C.

Al final de las tres fases (1 ciclo de PCR) ya se tiene el doble de ADN (viral) que se tenía al principio. Este procedimiento se repite por lo menos durante 30 ciclos hasta obtener el suficiente material para ser analizado.

Este mismo programa se utilizó para amplificación de ADN viral con los "primers" para geminivirus cpc715 y repv1978, TYLCV v21 y c287 y VMDF v47 y c1068.

### 3.2.11. Método de electroforesis

La electroforesis es una técnica para separar moléculas de proteínas o ácidos nucleicos de acuerdo a su tamaño o peso molecular a través de un material estacionario (gel de agarosa) mediante el efecto de un campo eléctrico (Hughes, 1999).

El principio de esta técnica está en que la dirección de la migración de las partículas de ADN estará determinada por acción del campo eléctrico formado, tomando en cuenta que las moléculas del ácido nucleico poseen carga negativa. En cambio, la tasa de migración de las partículas estará regida por el tamaño y forma de la partícula y la facilidad para desplazarse en la matriz del gel de agarosa. Por consiguiente, las partículas pequeñas y lineares tendrán una mayor tasa de migración que las partículas grandes o circulares (Hughes, 1999).

Es necesario dentro de los reservorios de la gel de agarosa incluir además de los marcadores moleculares (coctel de ADN de diferentes tamaños específicos) y las muestras de ADN amplificado, un control positivo y uno negativo. El control positivo puede ser una muestra de ADN conocida, de una planta enferma que haya sido amplificada por el mismo primer utilizado y el control negativo se requiere para eliminar la posibilidad de una mala interpretación de los resultados por contaminación de las muestras durante el proceso (se utiliza una planta sana confiable).

Para poder visualizar las bandas de la gel, producto de la migración (a un voltaje de 90), del ácido nucleico amplificado de las muestras, es necesario añadir una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) ya sea a la gel de agarosa o bien al buffer de corrida, Tris-Borato-EDTA (TBE) al 0.5 X. El propósito de esta solución es que el bromuro de etidio

se incorpore a la cadena de ADN del material de las muestras. El bromuro de etidio tiene la propiedad de fluorescer bajo la presencia de luz UV. Para este procedimiento se necesita el transiluminador (fuente de luz ultravioleta) en el que se coloca la gel con bromuro de etidio. Finalmente, se pueden visualizar las bandas de ADN y determinar la tasa de migración para compararla con los marcadores moleculares y el control positivo.

Para este ensayo se utilizaron dos tipos de gel de agarosa, al 1% y al 1.5%, dependiendo del peso molecular (pb) de la zona de la cápside del virus que sirvió para la elaboración de los "primers" específicos. En el caso de los "primers" universales para geminivirus, con un aproximado de 1400 pb se utilizaron geles al 1% de agarosa. Para los "primers" específicos para TYLCV, con un aproximado de 500 pb se utilizaron geles de agarosa al 1.5%. Esto se debe a que TYLCV al tener un menor número de pb, la migración de las moléculas de pequeño tamaño pueden visualizarse mejor bajo el transiluminador cuando tienen una matriz de agarosa más densa.

### 3.2.12. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico "MSTAT" CV 2.1.

## 3.3. EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA DE FRIJOL RESISTENTE A INFECCIONES VIRALES

### 3.3.1. Características del germoplasma

Se utilizaron seis variedades de frijol común, tres de las cuales poseen genes de resistencia a VMDF y tres variedades susceptibles a la infección. Las variedades mejoradas resistentes fueron Tío Canela 75, Dorado y Don Silvio; y las susceptibles Desarrural (1R), Catrachita y Danlí 46.

La variedad Tío Canela 75 fue desarrollada y liberada en 1996 por Zamorano como un cultivar resistente a enfermedades y tolerante a altas temperaturas (Rosas *et al.*, 1997). Fue desarrollada mediante la cruce triple DOR 483 x F1 (DOR 391 x Pompadour J) (Rosas y Varela, 1996).

Cuadro 5. Principales características de las variedades de frijol cultivadas en Honduras.

| Variedad      | Color de semilla | Días a M.F. | VMDF | VMSF | VMCF | BAT | ANT. | M.H. | ROY. | M.A. |
|---------------|------------------|-------------|------|------|------|-----|------|------|------|------|
| Tío Canela-75 | Rojo Brill.      | 68-70       | R    | S    | R    | I   | I    | I    | I    | S    |
| Don Silvio    | Rojo Ret.        | 70-75       | R    | S    | R    | I   | I    | I    | I    | I    |
| Dorado        | Rojo Ret.        | 73-77       | R    | S    | R    | I   | I    | I    | I    | I    |
| Desarrollal I | Rojo             |             | S    | R    | S    |     |      |      |      |      |
| Catrachita    | Rojo Brill.      | 63-65       | I    | S    | R    | S   | I    | S    | I    | S    |
| Danli 46      | Rojo Ret.        | 65-68       | S    | R    | S    | S   | I    | S    | S    | S    |

M.F. : Madurez Fisiológica, Brill : Brillante, Ret. : Rojo retinto, VMDF : Virus del Mosaico Dorado del Frijol, VMCF : Virus del Mosaico Común del Frijol, VMSF : Virus del Mosaico Severo del Frijol, BAT : Bacteriosis, MH : Muestra Hilachosa, ANT : Antracnosis, ROY : Roya, MA : Mancha angular, R= Resistente, I= intermedio, S= Susceptible.

Fuentes: DICTA (1998) y Voysest, O. (1983).

### 3.3.2. Ubicación del ensayo

El ensayo se llevó a cabo Zona III de la Unidad de Producción Hortícola (UPH) en Zamorano, Departamento de Francisco Morazán.

### 3.3.3. Descripción del ensayo experimental

El ensayo se desarrolló en un área total de 612 m<sup>2</sup>. Se utilizó una separación entre hileras de 1.0 m y entre plantas de 0.1 m. Se trazaron un total de 24 parcelas de cuatro surcos con aproximadamente 320 plantas por parcela. Se evaluaron un total de 6 variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

El diseño experimental utilizado fue un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con cuatro repeticiones por tratamiento.

### 3.3.4. Unidad experimental

3.3.4.1. Muestreo aleatorio. Una unidad experimental (UE) estuvo representada por una planta tomada al azar sintomática o no. Se tomaron cuatro plantas de cada parcela.

**3.3.4.2. Muestreo por síntomas.** En este caso una UE fue considerada como una planta individual con síntomas de infección viral. Se tomaron 16 plantas con diferentes síntomas de infección viral, independientemente del bloque o variedad. Los síntomas fueron documentados por escrito y mediante fotografías.

### 3.3.5. Variables

**3.3.5.1. Campo.** Las variables medidas en el ensayo de campo fueron :

- Número de mosca blanca por planta mediante una toma de datos semanal partiendo de dos semanas después de la siembra hasta cuatro semanas antes de la cosecha.
- Incidencia de infección viral a la sexta semanas post-siembra expresada en porcentaje de plantas sintomáticas.
- Severidad de la infección viral a la sexta semana post-siembra expresada en porcentaje de plantas con una infección alta, moderada o baja y plantas sanas o asintomáticas.

**3.3.5.2. Laboratorio.** Mediante procesos de laboratorio para determinar la presencia de ADN viral se tomaron las siguientes variables :

- Número de plantas con presencia de ADN de geminivirus mediante las técnicas de PCR y electroforesis, utilizando los "primers" universales para geminivirus de la Universidad de Wisconsin cpc715 y repv1978.
- De las plantas que se determinaron positivas a los "primers" de geminivirus universal se hizo una prueba mediante PCR y electroforesis para detectar la presencia ADN de VMDF utilizando los "primers" para VMDF de la Universidad de Wisconsin v21 y c287.

### 3.3.6. Manejo del cultivo

La siembra se realizó el día 29 de octubre de 1999. Dos semanas antes de la siembra se aplicó el herbicida el Prowl (pendimentalina) a razón de 2 l de producto comercial por hectárea. Una semana después de la siembra se depositaron cebos atrayentes para el control de babosa. La emergencia de las plántulas tuvo lugar una semana después de la siembra. Al momento de la siembra se realizó una fertilización con fórmula 18-46-0. El riego proporcionado fue por aspersión hasta 4 semanas antes de la cosecha que se realizó el día 24 de enero del 2000. Tres semanas después de la emergencia se realizó una deshierba manual y fertilización con Urea. Una última deshierba se realizó a la sexta semana después de la emergencia.

La cosecha se realizó cuando todas las variedades llegaron a senescencia en el campo y sólo se cosecharon las parcelas útiles que consistieron en los dos surcos centrales de cada parcela dejando por fuera 0.5 m a cada extremo de los surcos. El aporreo se realizó manualmente cuando todo el material estuvo completamente seco.

### **3.3.7. Muestreos de campo**

**3.3.7.1. Mosca blanca.** Para la realización del muestreo semanal de la población de mosca blanca se tomó en cuenta una hoja trifoliada superior completamente desarrollada de cinco plantas de frijol por parcela. Durante la primera etapa de desarrollo se muestreó la planta de frijol en su totalidad. Se contabilizó el número de moscas blancas en estado adulto posando sobre el envés de las hojas.

**3.3.7.2. Tejido vegetal.** La recolección del tejido vegetal sea ya para el caso del muestreo aleatorio o por síntomas de plantas individuales se realizó mediante la recolección de material proveniente de los brotes terminales en crecimiento activo, fresco, tierno y sin daño por algún otro patógeno que no sea viral.

El muestreo aleatorio y por síntomas de plantas específicas se realizó a los 45 días después de la siembra.

### **3.3.8. Equipo y material de laboratorio**

El equipo y material de laboratorio para la extracción y purificación de ADN (planta y viral) y para la amplificación del ADN viral por PCR y visualización de los resultados por electroforesis fue el mismo utilizado para el cultivo de tomate (numeral 3.1.7), con la diferencia que se utilizaron además de los "primers" Geminivirus universal 715 y 1978, los "primers" VMDF v47 y c1068 (Cuadro 4) y se utilizó gel de agarosa al 1% dado el tamaño del ADN producto de PCR.

### **3.3.9. Método de extracción y purificación de ADN**

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN total (planta y viral) de Doyle & Doyle (Anexo 1).

### **3.3.10. Método de amplificación de ADN**

Se utilizó el método de PCR descrito en el numeral 3.1.10.

### **3.3.11. Método de electroforesis**

Los resultados de la amplificación del ADN por PCR se visualizaron por la técnica de electroforesis descrita en el numeral 3.1.11.

Como se mencionó anteriormente, sólo se utilizó gel de agarosa al 1% para visualizar los resultados de la amplificación de ADN utilizando los "primers" universales de geminivirus y los de VMDF

### **3.3.12. Análisis estadístico**

Se utilizó el paquete estadístico "MSTAT" CV 2.1.

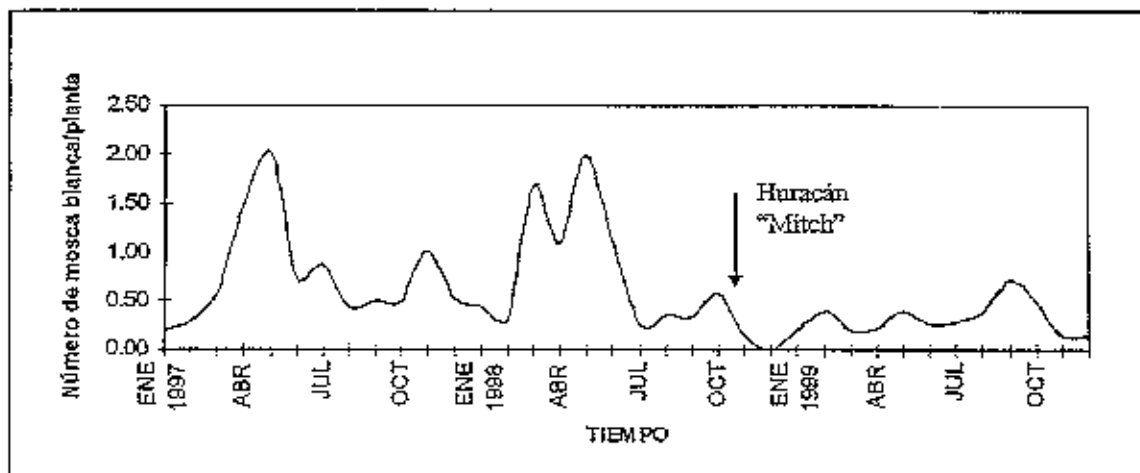
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. DINÁMICA POBLACIONAL DE MOSCA BLANCA EN ZAMORANO

Las variaciones climáticas influyen directamente sobre la presencia de plagas y enfermedades. En el caso de la mosca blanca, el clima que favorece su proliferación es el cálido y seco. El año de 1998 se caracterizó por ser sumamente árido, incluso se afirma que la estación seca correspondió a la peor sequía ocurrida en varias décadas; lo que favoreció a una alta población de mosca blanca y por ende, presencia de geminivirus en las zonas productoras de Honduras haciendo casi imposible la obtención de rendimientos satisfactorios.

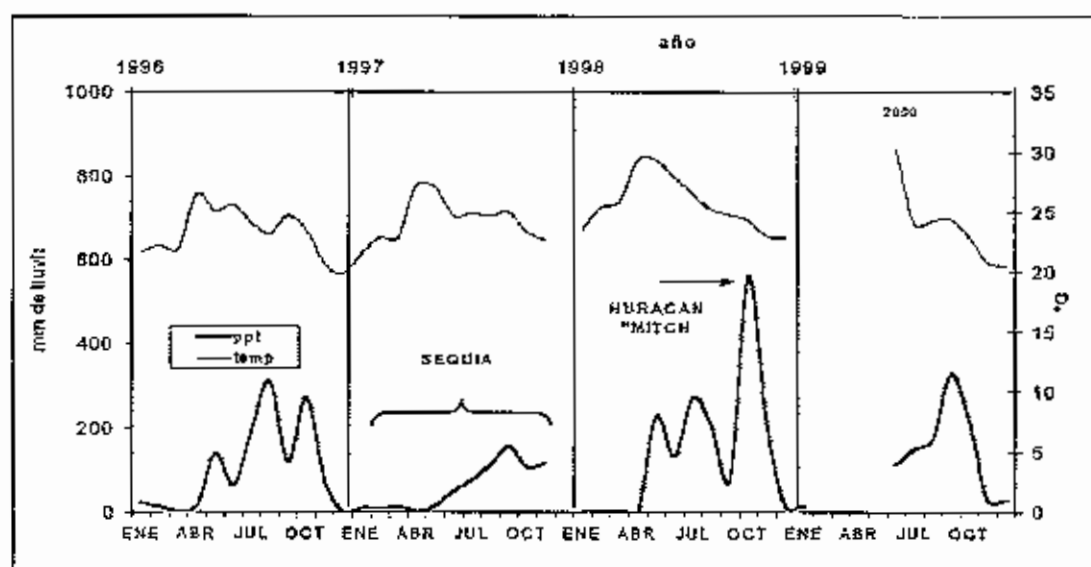
A lo largo de 1997 y 1998 se observó una elevación de las poblaciones de mosca blanca alrededor de los meses de la estación seca y caliente en Zamorano (Marzo a Junio) (Figura 2). Durante 1999, no se pudo apreciar esta tendencia a consecuencia del Huracán "Mitch" que afectó a Honduras del 30 de Octubre al 1 de Noviembre de 1998. Durante este fenómeno se produjo una precipitación cercana a los 600 mm, comparado con los 700 mm aproximados que se dieron a lo largo de 1997. La presencia del Huracán "Mitch" alteró las condiciones abióticas favorables para este insecto vector. Desde mediados de Diciembre de 1998 hasta mediados de Enero de 1999 la población de mosca blanca se vio reducida a cero (Figura 1).

Figura 1. Dinámica poblacional de mosca blanca en Zamorano de Enero 1997 a Diciembre 1999.



En 1999 se observa que las poblaciones de mosca blanca no siguieron el patrón poblacional que se observó en años anteriores. En los meses de Febrero a Junio de 1997 y 1998 las poblaciones del insecto alcanzaron niveles de hasta dos individuos por planta. Durante los mismos meses en 1999 las poblaciones alcanzaron niveles aproximados de 0.5 insectos por planta. Esto se pudo deber a que 1999 fue un año en el que posiblemente se experimentaron altas precipitaciones a causa de que la estación lluviosa se extendió en relación a años anteriores. Lamentablemente esta afirmación no se puede visualizar en el Figura 2 por falta de datos en los primeros meses de ese año.

Figura 2. Precipitación total y temperatura promedio mensual desde Enero de 1996 hasta Diciembre de 1999 en Zamorano.



## 4.2. TOMATE

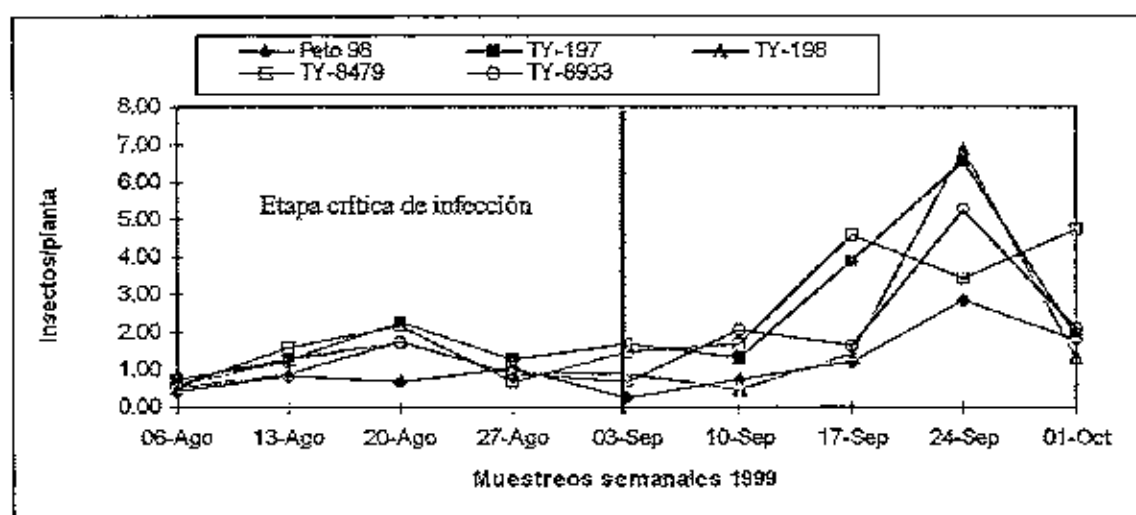
La principal limitante en este experimento fue la alta incidencia de agentes fitopatógenos de etiología no viral, incluyendo las bacterias y hongos del suelo *Pseudomonas (Rallossia) spp.* y *Fusarium oxysporum*, que afectaron al cultivo desde etapas tempranas de desarrollo. Los efectos de estas enfermedades como disminución de vigor de las plantas, se observaron posteriormente cuando se presentó un ataque fuerte de *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani* en la etapa de formación de fruto. Las variedades que sucumbieron al ataque de estos dos hongos fueron PETO 98 y TY-197, que presentaron alta incidencia de infección temprana de las enfermedades causadas por bacterias y hongos del suelo, anteriormente mencionadas. Las variedades TY-198, TY-8479 y TY-8933 mostraron un mejor desempeño ante la incidencia de enfermedades tardías. Estas variedades mostraron tolerancia a las bacterias y hongos del suelo que atacaron en etapas tempranas de desarrollo a las dos variedades restantes evaluadas. Esto explica la posibilidad de la existencia de genes de resistencia a varios agentes fitopatógenos y no solamente a infecciones por geminivirus.

#### 4.2.1. Muestreos semanales de adultos de mosca blanca

A lo largo del ciclo del cultivo (Agosto-October, 1999), se observó una alta población del insecto vector (mosca blanca), debido a las condiciones climáticas (sequía y calor) favorables (Figura 1 y 2). Con este nivel poblacional se aseguró una pronta infección por geminivirus.

El muestreo de adultos de mosca blanca se realizó en cada repetición de las cinco variedades. Se muestreó de esta manera para identificar posibles diferencias en el número de insectos por variedad, al observarse diferentes grados de preferencia de la mosca blanca hacia las variedades.

Figura 3. Muestreo semanal de adultos de mosca blanca en cinco variedades de tomate.



En estudios preliminares citados por Sponagel y Fúnez (1994), se determinó que a partir de los 30 a 40 días después del trasplante (DDT) de un ensayo de tomate, el grado de infestación asciende drásticamente por la eclosión de la primera generación de adultos sedentarios.

En el presente ensayo, la fecha de eclosión de la primera generación de adultos sedentarios de mosca blanca correspondió a los 42 DDT, cuando la población de insectos muestreados ascendió drásticamente (Figura 3).

Según ensayos citados por Sponagel y Fúnez (1994), existe una "resistencia por edad" hacia infecciones por geminivirus. Se determinó que el succionamiento de la mosca blanca en las primeras cuatro semanas DDT es importante para la transmisión del virus. La alta población observada desde la cuarta semana en adelante, posiblemente no tuvo ningún efecto en la infección de geminivirus entre las variedades, pero definitivamente inciden en la población inicial de mosca blanca para un cultivo de relevo posterior y de

esta manera, la presencia de geminivirus en la etapa crítica de infección (4 semanas después del trasplante).

Peto 98 mostró un bajo número de mosca blanca por planta con relación a las variedades mejorada, debido al estado fisiológico y físico que presentó a consecuencia de la temprana y fuerte infección por enfermedades virales y no virales que sufrió. Esta condición de estrés que experimentó PETO 98 probablemente causó que la mosca blanca mostrara preferencia por las otras variedades más suculentas, verdes y posiblemente más palatables.

#### **4.2.2. Incidencia y severidad de infección viral en tomate**

Los valores porcentuales de incidencia de infección viral fueron determinados visualmente a cada repetición de cada variedad, en relación al total de plantas presentes en ese momento en cada parcela. Cabe mencionar que se tomaron en cuenta plantas sintomáticas a infecciones virales en general, sin diferenciar síntomas de geminivirus ya que es imposible distinguir visualmente un virus de otro a causa de similitudes en sintomatología e infecciones mixtas.

Los datos de severidad también fueron determinados visualmente bajo tres grados de acuerdo a los síntomas: alta, media o baja. Plantas con una severidad de infección viral alta fueron consideradas aquellas que presentaban achaparramiento agudo y generalizado, encrespamiento total de las hojas, y amarillamiento (o clorosis) severo en el caso de que se presentara. Una infección medianamente severa fue considerada como achaparramiento moderado en ciertas partes de la planta, encrespamiento y/o amarillamiento leve en todas o la mayoría de las hojas. Se clasificó como severidad baja a aquellas plantas que no mostraban achaparramiento y apenas algunas hojas mostraban encrespamiento y/o amarillamiento leve.

Cuadro 6. Incidencia y severidad de infección viral de cinco variedades de tomate.

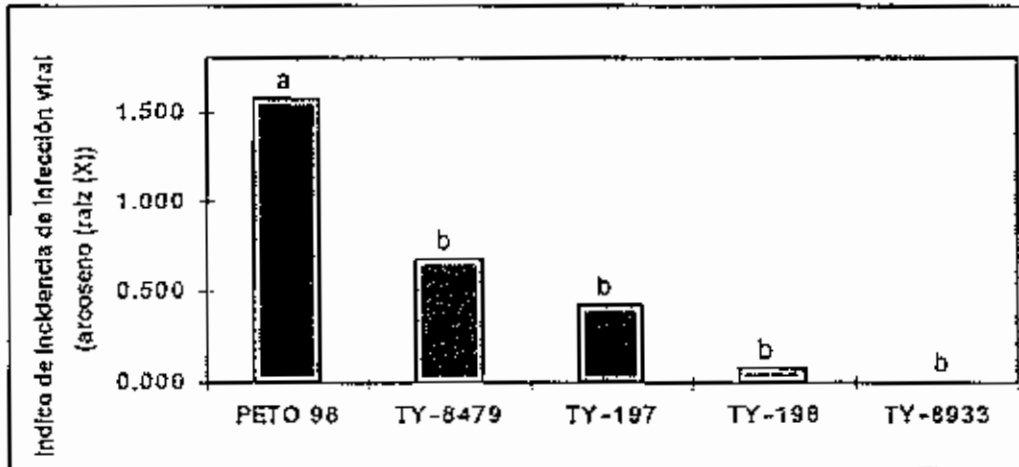
| Variedad | Repetición | Incidencia (%) | Severidad |
|----------|------------|----------------|-----------|
| PETO 98  | 1          | 100.00         | A         |
|          | 2          | 100.00         | A         |
|          | 3          | 100.00         | A         |
| TY-197   | 1          | 88.89          | M         |
|          | 2          | 5.88           | B         |
|          | 3          | 0.00           | .         |
|          | 4          | 72.22          | M         |
| TY-198   | 1          | 0.00           | .         |
|          | 2          | 5.56           | B         |
|          | 3          | 0.00           | .         |
|          | 4          | 0.00           | .         |
|          | 5          | 0.00           | .         |
| TY-8479  | 1          | 17.65          | B         |
|          | 2          | 35.29          | B         |
|          | 3          | 68.42          | B         |
| TY-8933  | 1          | 0.00           | .         |
|          | 2          | 0.00           | .         |
|          | 3          | 0.00           | .         |
|          | 4          | 0.00           | .         |
|          | 5          | 31.58          | B         |

A : alta, M : media, B : baja.

**4.2.2.1. ANDEVA.** Para los valores de incidencia de infección viral del Cuadro 6 fue necesario hacer una transformación de los datos mediante la fórmula :  $\arcseno(\text{raiz}(X))$ , recomendada para datos porcentuales con un amplio rango de valores (Steel y Torrie, 1988). Se obtuvo una diferencia significativa entre las variedades ( $P=0.0037$ ), con un coeficiente de variación de 62.06% debido a los distintos niveles de reacción a infecciones virales entre variedades.

**4.2.2.2. Prueba Duncan para separación de medias.** Se encontró que PETO 98 presentó un índice de incidencia de infección viral mucho mayor a todas las otras variedades (Figura 4), lo cual fue observado visualmente en el campo desde que los primeros síntomas de infección viral fueron expresados por las variedades.

Figura 4. Separación de medias por la Prueba Duncan del índice de infección viral de cinco variedades de tomate.



#### 4.2.3. Rendimiento de tomate

Debido a la pérdida de plantas, excesiva en algunas variedades, por la incidencia de enfermedades causadas por *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas (Rafflossia)* sp., *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, y hongos del complejo del "Mal del talluelo", se tuvo que realizar un análisis de covarianza (ANCOVA) para ajustar los valores de rendimiento al número de plantas cosechadas. La fórmula de ajuste de rendimiento que se utilizó fue la siguiente:

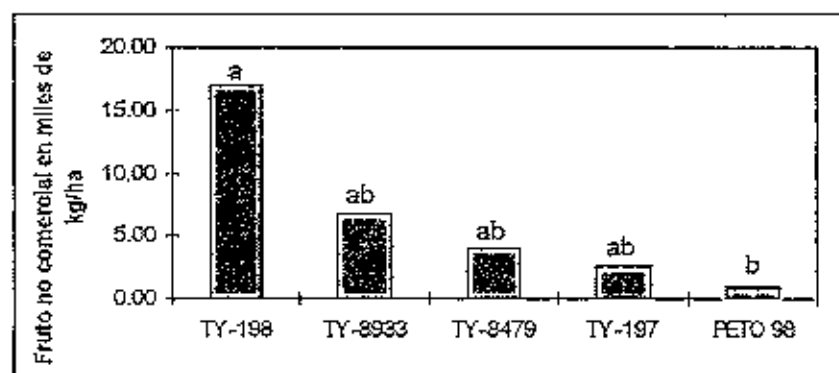
$Y_{adj} = (\text{kg de fruto/parcela}) * (\text{plantas/ha}) / (\text{plantas/parcela})$ , donde :

$Y_{adj}$  = rendimiento ajustado en kg/ha  
 plantas/ha = 40000

4.2.3.1. ANDEVA. Se obtuvo un coeficiente de variación de 115.97% debido al tamaño reducido del ensayo y a variaciones en la reacción diferencial de las variedades a los diversos agentes fitopatógenos, incluyendo las infecciones virales. No hubo diferencia significativa entre variedades, adjudicándose así la gran variación de rendimientos a efectos del error experimental.

4.2.3.2. Prueba Duncan para separación de medias. La variedad que mostró un mejor desempeño en rendimiento fue TY-198. TY-8933, TY-8479 y TY-197 tuvieron rendimientos similares según la prueba Duncan. PETO 98 mostró el desempeño más bajo (Figura 5).

Figura 5. Separación de medias mediante la Prueba Duncan para valores de rendimiento en kg/ha para cinco variedades de tomate.



Cabe aclarar que no fue posible obtener datos de rendimiento de fruto comercial dada la alta presión de agentes fitopatógenos a los cuales se vieron expuestas las variedades durante este ensayo.

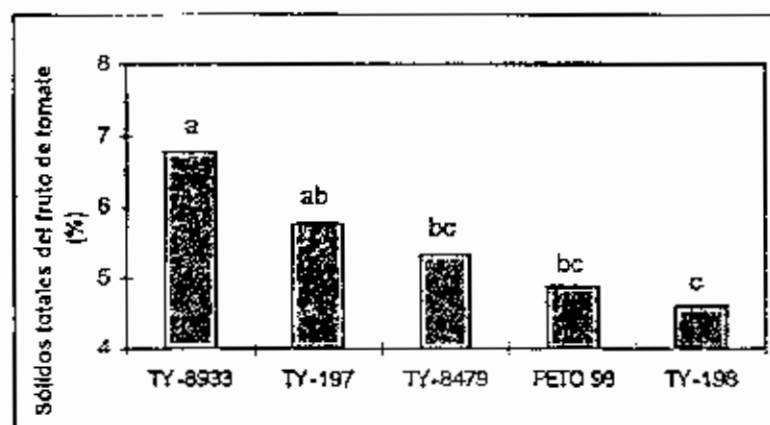
#### 4.2.4. Sólidos totales en tomate

El porcentaje de sólidos totales en el fruto de tomate es decisivo para determinar el uso que se le puede dar a esta hortaliza, ya sea para consumo fresco o procesamiento industrial. Valores altos de sólidos totales favorecen los procesos industriales dando mejor consistencia al producto elaborado.

**4.2.4.1. ANDEVA.** Se obtuvo diferencias altamente significativas entre variedades ( $P=0.0012$ ,  $\alpha=0.05$ ), y un coeficiente de variación de 19.79%.

**4.2.4.2. Prueba Duncan para separación de medias.** Se determinó que la variedad con un mayor porcentaje de sólidos totales fue TY-8933, seguida por TY-197. TY-8479 y PETO 98 tuvieron valores de sólidos totales similares, y TY-198 fue la variedad con el menor valor para esta variable (Figura 6).

Figura 6. Separación de medias mediante la Prueba Duncan para valores de sólidos totales de frutos de cinco variedades de tomate.



#### 4.2.5. Muestras de tejido foliar para el análisis por PCR

Para la recolección de muestras de tejido vegetal se escogieron las hojas tiernas, provenientes de brotes terminales sanos.

##### 4.2.5.1. Muestreo aleatorio

Para el muestreo aleatorio de material vegetal se escogieron al azar un total de seis plantas por variedad indistintamente de la repetición en donde se encontraron. Se realizó este muestreo para determinar la presencia de geminivirus en plantas sintomáticas como asintomáticas a infecciones virales.

Solamente 3 plantas de un total de 30 recolectadas aleatoriamente presentaron sintomatología a infecciones de tipo viral; debido a que el muestreo se realizó tres semanas DDT, probablemente las infecciones virales todavía no habían sido expresadas en el fenotipo del germoplasma. Las 3 muestras sintomáticas pertenecían a las líneas TY-197 (2 muestras) y TY-8933 (1).

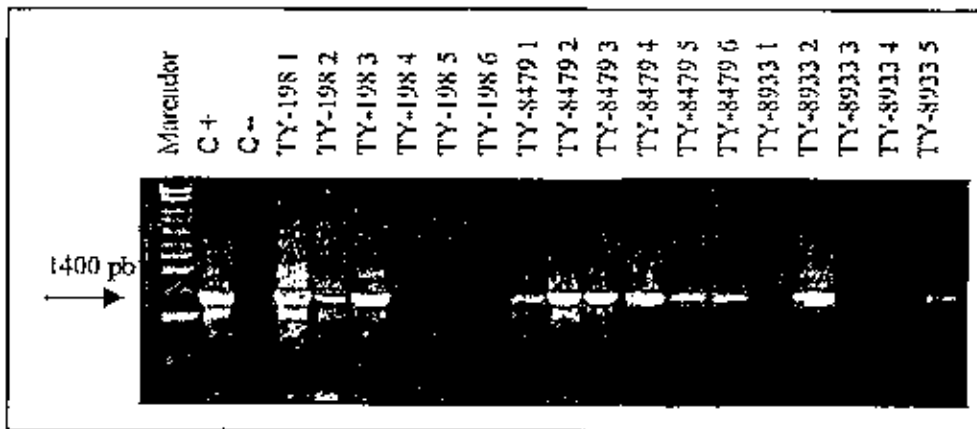
Cuadro 7. Plantas positivas a geminivirus ("primers" cpc715 y repv 1978) y a TYLCV ("primers" v21 y c287) en cinco variedades de tomate.

| Variedad | No. plantas asintomáticas | No. plantas sintomáticas | No. plantas geminivirus positivo | No. plantas TYLCV positivo |
|----------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| PETO 98  | 6                         | 0                        | 1                                | 1                          |
| TY-197   | 4                         | 2                        | 1                                | 1                          |
| TY-198   | 6                         | 0                        | 3                                | 3                          |
| TY-8479  | 6                         | 0                        | 5                                | 2                          |
| TY-8933  | 5                         | 1                        | 3                                | 0                          |

En el Cuadro 7 se observa que PETO 98, sin poseer genes de resistencia a infecciones por geminivirus, mostró síntomas tardíos de infección, al igual que TY-198 y TY-8479, con relación a las dos variedades restantes que mostraron ser resistentes.

Se determinó la presencia de ADN de geminivirus en muestras asintomáticas en las variedades, PETO 98, TY-198 y TY-8479. Las muestras sintomáticas que resultaron negativas a geminivirus y las positivas a geminivirus que fueron negativas a TYLCV indican la presencia de otro(s) geminivirus que no se detectaron con los "primers" específicos.

Figura 7 . Resultados de PCR para geminivirus ("primers" epc715 y repv1978) en plantas de tomate (muestreo aleatorio)

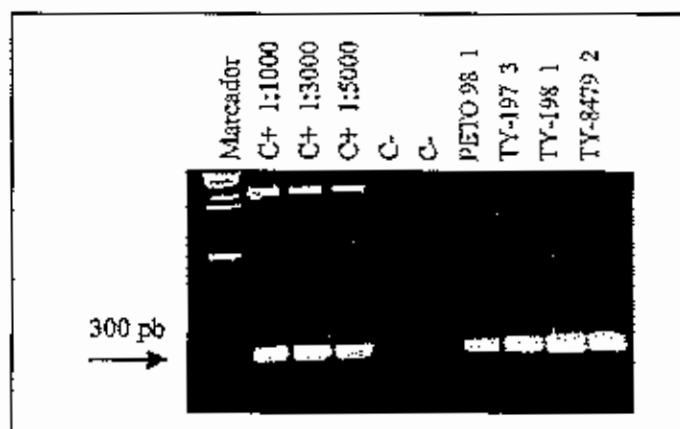


C+: control positivo, C-: control negativo, pb: pares de bases nitrogenadas.

En la prueba de PCR para TYLCV utilizando los "primers" específicos v21 y c187 se observó que tres de las variedades israelíes y PETO 98 mostraron la presencia de ADN de TYLCV. La mayoría de las muestras de TY-8479 y todas las de TY-8933 positivas a geminivirus resultaron negativas a TYLCV. Estos resultados sugieren la presencia de algún otro tipo de geminivirus que no sea TYLCV presente en el cultivo.

Se realizaron varias diluciones (1:1000, 1:3000, 1:5000 y 1:10000) del control positivo (aislamiento de Egipto) para disminuir la intensidad de una banda de gran peso molecular que no corresponde al peso del TYLCV (300 pb) (Figura 8). El mejor resultado se obtuvo con la dilución 1:10000.

Figura 8. Resultados de PCR para TYLCV ("primers" v21 y c287)



C+: control positivo, C-: control negativo, pb: pares de bases.

#### 4.2.5.2. Muestreo por síntomas

Este tipo de muestreo se realizó con el objetivo de identificar los distintos síntomas presentes en el ensayo y determinar el porcentaje de muestras positivas a geminivirus y a TYLCV.

Para el caso, se identificaron 10 plantas de tomate (dos de cada variedad), independientemente de la ubicación de estas entre las repeticiones. Los síntomas y características de las muestras recolectadas se presentan en el Anexo 2.

De las 10 muestras recolectadas, al someterlas a la prueba de PCR utilizando los "primers" universales a geminivirus cpc 715 y repv 1978, el 100% resultaron positivas a geminivirus.

Posteriormente a las muestras en su totalidad se les sometió a PCR utilizando los "primers" específicos para TYLCV v21 y c187. Ninguna de estas muestras resultó positiva a este virus.

Este muestreo se realizó nuevamente tres semanas después recolectando muestras de las mismas plantas de donde se obtuvieron en el primer muestreo. Los resultados por PCR utilizando los "primers" universales a geminivirus dieron resultados positivos, confirmando previos resultados. Es importante señalar que las bandas del producto de la electroforesis, al ser visualizadas bajo la fuente de luz ultravioleta, mostraron ser más pronunciadas que en el primer muestreo, posiblemente debido a una mayor acumulación de geminivirus en el tejido infectado.



### 4.3.3. Incidencia y severidad de infección viral en frijol

Para la toma de datos se utilizaron los mismos patrones citados en el numeral 4.2.2.

Cuadro 8. Incidencia y severidad de infección viral en seis variedades de frijol común.

| Variedad      | Repetición | Incidencia (%) | Severidad |
|---------------|------------|----------------|-----------|
| DON SILVIO    | 1          | 7.00           | B         |
|               | 2          | 0.00           | .         |
|               | 3          | 0.00           | .         |
|               | 4          | 0.30           | M         |
| DORADO        | 1          | 0.00           | .         |
|               | 2          | 0.00           | .         |
|               | 3          | 0.00           | .         |
|               | 4          | 0.30           | B         |
| DESARRURAL    | 1          | 15.00          | M         |
|               | 2          | 55.00          | M         |
|               | 3          | 70.00          | M         |
|               | 4          | 90.00          | A         |
| DANLI 46      | 1          | 60.00          | A         |
|               | 2          | 50.00          | M         |
|               | 3          | 60.00          | M         |
|               | 4          | 70.00          | A         |
| CATRACHITA    | 1          | 0.30           | A         |
|               | 2          | 15.00          | B         |
|               | 3          | 1.00           | B         |
|               | 4          | 2.00           | B         |
| TIO CANELA-75 | 1          | 0.60           | M         |
|               | 2          | 0.30           | A         |
|               | 3          | 0.00           | .         |
|               | 4          | 1.00           | B         |

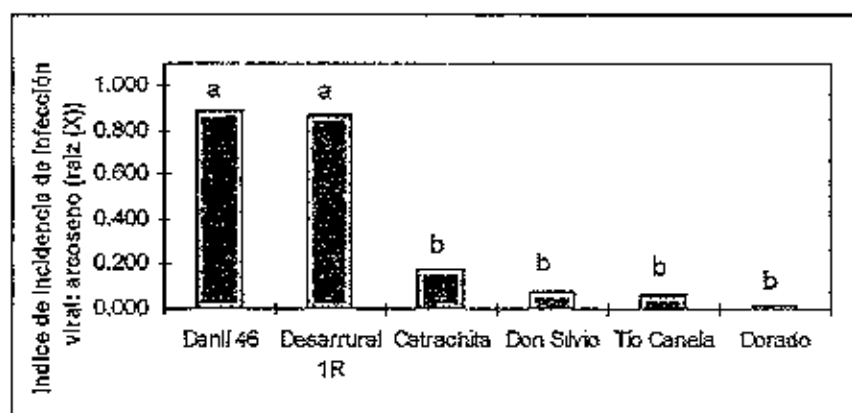
A : alta, M : media, B : baja

Para realizar el análisis estadístico se tuvo que transformar los datos mediante la fórmula arcoseno (raíz  $(X)$ ), debido a mucha diferencia entre los datos porcentuales de incidencia de las variedades (Steel y Torrie, 1988).

**4.3.3.1. ANDEVA.** Se encontró una alta significancia ( $P > 0.0001$ ) entre la diferencia para la incidencia de infecciones virales entre variedades. El coeficiente de variación fue de 50.44% indicando la presencia de resistencia varietal ante este tipo de agentes fitopatógenos.

**4.3.3.2. Prueba Duncan para separación de medias.** Las variedades criollas Danlí 46 y Desarrural (IR) mostraron los más altos niveles de incidencia de infección viral, sin existir diferencia entre éstas (Figura 10).

Figura 10. Separación de medias mediante la Prueba Duncan para valores transformados de incidencia de infección viral de seis variedades de frijol común.



#### 4.3.4. Rendimiento de frijol

Para obtener el valor de rendimiento para cada variedad, se tomó el dato del número de plantas cosechadas de cada repetición. Posteriormente se ajustó el rendimiento al número de plantas y a un porcentaje de humedad dado. Se utilizó la siguiente fórmula para el caso:

$\text{kg/ha} = \text{peso de grano por parcela (g)} * ((\# \text{ plantas/ha}) / (\# \text{ plantas/parcela} * 1000)) * ((100 - \% \text{ humedad}) / (100 - \% \text{ humedad deseado}))$ , en donde :

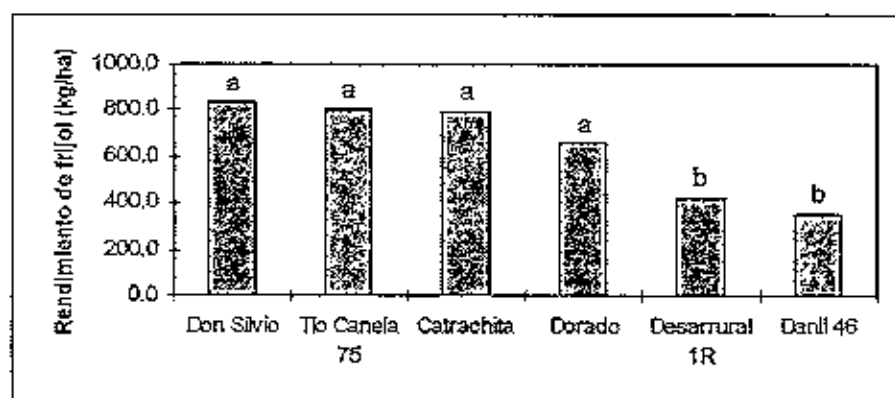
# plantas/ha= 100000

% humedad deseado= 13

**4.3.4.1. ANDEVA.** Se observó una diferencia significativa del rendimiento entre las variedades ( $P=0.002$ ,  $\alpha=0.05$ ), con un coeficiente de variación del 20.77%. No hubo diferencia significativa entre repeticiones.

**4.3.4.2. Prueba Duncan para separación de medias.** Se determinó que las variedades mejoradas Don Silvio, Tío Canela-75 y Dorado, y Catrachita no tuvieron diferencias en el rendimiento obtenido, pero fueron superiores a Desarrural y Danlí 46 (Figura 11).

Figura 11. Separación de medias mediante la Prueba Duncan para valores de rendimiento de seis variedades de frijol común.



#### 4.3.5. Muestras de tejido foliar para análisis por PCR

Se utilizaron las mismas consideraciones para la recolección de foliar vegetal especificado en el numeral 4.2.5.

Tanto el muestreo por síntomas como el aleatorio se realizaron con diferencia de tres días entre el uno y el otro, durante la tercera semana de Diciembre.

##### 4.3.5.1. Muestreo aleatorio

Para el muestreo aleatorio se escogieron 4 plantas de cada variedad y de cada repetición, dando un total de 96 muestras sintomáticas y asintomáticas (Anexo 2).

Cuadro 9. Plantas positivas a geminivirus ("primers" cpc715 y repv1978) y a VMDF ("primers" v47 y cl068) en seis variedades de frijol común.

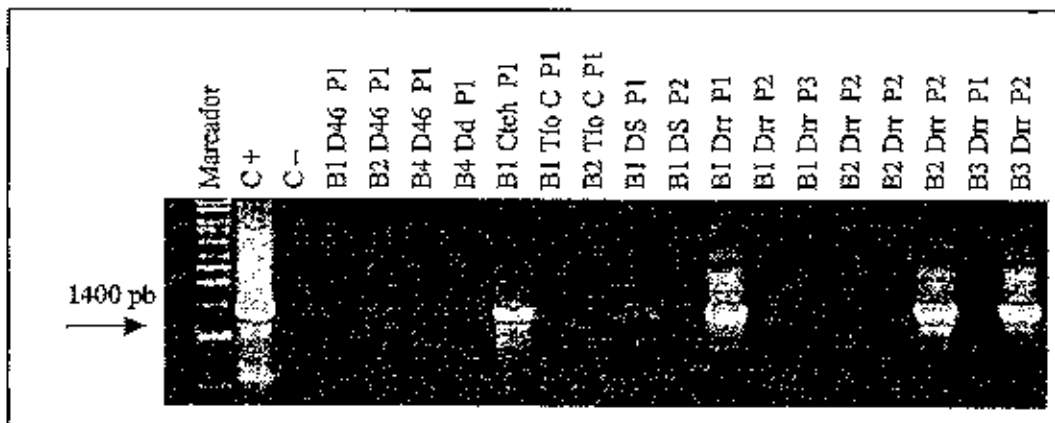
| Variedad        | No. plantas asintomáticas | No. plantas sintomáticas | No. plantas geminivirus positivo | No. plantas VMDF positivo |
|-----------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Tío Canela 75   | 16                        | 0                        | 0                                | 0                         |
| Don Silvio      | 16                        | 0                        | 0                                | 0                         |
| Catrachita      | 16                        | 0                        | 0                                | 0                         |
| Desarrural (1R) | 1                         | 15                       | 1                                | 1                         |
| Danlí 46        | 3                         | 13                       | 2                                | 1                         |
| Dorado          | 16                        | 0                        | 0                                | 0                         |

Existe un gran número de muestras sintomáticas de las variedades Desarrural (1R) y Danlí 46 que no muestran resultados positivos a geminivirus utilizando los "primers" generales cpc715 y repv1978. Esto podría significar que en promedio, un 90% de las plantas muestran la presencia de ADN viral distinto a geminivirus (Cuadro 9).

#### 4.3.5.2. Muestreo por síntomas

Se recolectaron un total de 16 muestras que mostraron diversos síntomas de infecciones virales. Las plantas fueron escogidas independientemente de la variedad y de las repeticiones.

Figura 12. Resultados de PCR para geminivirus ("primers" cpc715 y repv1978) en frijol (muestreo individual por síntomas).



B1: bloque 1, B2: bloque 2, B3: bloque 3, B4: bloque 4, D46: Danlí 46, Dd: Dorado, Cteh: Catrachita, Tío C: Tío Canela-75, DS: Don Silvio, Drr: Desarrural, P1: planta #1, P2: planta #2, P3: planta #3, pb: pares de bases nitrogenadas.

Un 50% de las plantas sintomáticas resultaron positivas a geminivirus a través de PCR utilizando los "primers" cpc715 y repv1978, y pertenecieron a las variedades Danlí 46, Catrachita, Don Silvio y Desarrural. Muestras sintomáticas de Tío Canela-75, así como de Dorado, no mostraron resultados positivos a geminivirus (Cuadro 9).

Al total de muestras sintomáticas a infecciones virales que resultaron positivas a geminivirus se sometieron a PCR utilizando los "primers" específicos para VMDF v47 y c1068. Todas las muestras a excepción de dos, pertenecientes a las variedades Desarrural (1R) y Danlí 46, resultaron positivas a VMDF utilizando los "primers" mencionados (Cuadro 9) (Anexo 2). No se puede afirmar que todas las plantas positivas a VMDF contienen ADN de este virus específico, pues en estudios anteriores, los "primers" v47 y c1068 detectaron el virus en un amplio rango de cultivos diferentes al frijol (Doyle *et al.*, 1998).

Muestras que se identificaron como VMDF pero que no mostraban síntomas característicos, posiblemente debido a la reacción fenotípica del germoplasma, fueron analizadas para VMDF con los "primers" específicos en Zamorano, resultando negativas. Para corroborar estos resultados, las muestras fueron enviadas al CIAT en Colombia en donde se analizaron para VMDF por PCR, resultando negativas, corroborando los resultados obtenidos anteriormente. Esta información explica la compleja etiología viral y la importancia de una pronta identificación de los virus presentes en la zona para iniciar un manejo certero.

## 5. CONCLUSIONES

Las poblaciones de mosca blanca durante 1999 no alcanzaron los niveles críticos observados en años anteriores dadas las condiciones climáticas desfavorables al insecto. A pesar de este hecho, la infección por geminivirus estuvo presente en los cultivos evaluados, con menor incidencia en el frijol; esto demuestra la efectividad de la mosca blanca como vector de geminivirus posiblemente debido a un alto nivel de virulencia del insecto presente en la zona. Prácticas de manejo como concentración de la producción de tomate y frijol en época de frío y lluvia causaría una disminución en la infección de geminivirus presente en el campo; pero se podría comprometer la producción a causa de la incidencia de otras enfermedades no virales favorecidas por estas condiciones climáticas como son Tizón tardío en tomate y Roya y Mancha angular en frijol.

Las variedades mejoradas de tomate TY-198, TY-8479 y TY-8933 mostraron un buen desempeño ante enfermedades causadas por bacterias y hongos del suelo presentes en los primeros días después del transplante. La presencia de genes de resistencia a geminivirus y su buena condición fisiológica ayudó a las variedades a resistir la presencia de otras enfermedades. Los resultados obtenidos en el presente ensayo de evaluación de germoplasma mejorado, demuestran que los esfuerzos de instituciones agrícolas por desarrollar material genéticamente adaptado a factores adversos está dando resultados reales que pueden favorecer a la producción actual de alimentos a nivel mundial. Se puede concluir que la resistencia genética es la única forma viable de manejo contra geminivirus a corto plazo y largo plazo, si no existen leyes que impongan vedas estacionales de cultivos claves, que no es una opción económicamente viable en muchos lugares.

Las mismas variedades mencionadas anteriormente mostraron los niveles más bajos de incidencia y severidad causadas por infecciones virales de diversas especies. A pesar de esto, TY-198 obtuvo los mayores rendimientos, destacándose entre el resto de variedades mejoradas de tomate. Sin embargo, el uso de TY-198 sería el de "tomate de mesa" dados los bajos niveles de sólidos totales que presentó, haciéndola no apta para procesamientos industriales. En todo caso, TY-8933 que mostró rendimientos un poco menores, pero obtuvo el mayor nivel de sólidos totales, puede ser un germoplasma promisorio para el procesamiento industrial.

En pruebas preliminares que necesitan ser confirmadas por análisis de secuenciación, se detectó por primera vez, la presencia del virus del amarillamiento de las hojas en cuchara del tomate (TYLCV) en muestras obtenidas de este ensayo. Ante este posible precedente y sabiendo que *Bemisia argentifolii* es el único insecto vector de este virus, y que no ha sido anteriormente reportado en Honduras, se podría inferir que el vector se encuentra

actualmente en este territorio. Las repercusiones de este resultado en el manejo de enfermedades de etiología viral en el cultivo de tomate comprometerían aún más la producción actual, dado el poco conocimiento y preparación de instituciones del agro nacional para afrontar este nuevo problema que ha sido devastador en otras partes del mundo.

Las variedades mejoradas de frijol Tío Canela 75, Dorado, Don Silvio y Catrachita mostraron el mejor desempeño en rendimiento frente a las otras variedades criollas; esto se debió básicamente a los bajos niveles de incidencia y severidad que mostraron ante la presencia de infecciones virales de diversos tipos. Con esto, se asegura la existencia de germoplasma de frijol resistente a geminivirus y otras enfermedades virales, como una opción de manejo actual para asegurar la producción de este grano de importancia alimenticia y cultural en la región.

Según la prueba de PCR y los "primers" utilizados en muestras de tomate y frijol, se demostró la posibilidad de la presencia de otros tipos de virus (además de geminivirus), o factores abióticos y/o de manejo que están causando distorsiones fenotípicas similares a síntomas causados por enfermedades virales. Esto demuestra la importancia de realizar estudios subsiguientes que demuestren la presencia o no de otras enfermedades de etiología viral. De esta manera se podría recurrir a la búsqueda de prácticas de manejo, incluyendo la resistencia varietal para así contrarrestar el efecto detrimental que estas enfermedades o condiciones causan sobre el rendimiento.

Lo anterior se sustenta con los resultados obtenidos en el CIAT, Colombia, en los que muestras de frijol procedentes de este ensayo, con síntomas característicos a VMDF, se determinó la ausencia de ADN de este geminivirus. Esto asegura la complicada epidemiología viral en relación a la sintomatología ante la presencia del virus y la expresión fenotípica, dependiendo del material vegetal. Esto conduce a la necesidad de recurrir a técnicas de diagnóstico cada vez más precisas para identificar correctamente enfermedades virales y de otra etiología.

## 6. RECOMENDACIONES

Secuenciar el genoma completo de ADN del TYLCV encontrado para asegurar la presencia o no de este virus, mediante el apoyo de universidades del exterior (U.de Wisconsin).

Iniciar un estudio para determinar la presencia de *Bemisia argentifolii* (Bellows & Perring) en Honduras, pues es considerado como el único vector reportado de TYLCV.

Si el TYLCV encontrado perteneciera a la cepa IS, no se recomienda siembras de tomate en secuencia con frijol, o cultivos vecinos de estas dos plantas, pues se ha reportado que el frijol actúa como reservorio del TYLCV-IS.

Elaborar programas nacionales de información sobre la presencia de TYLCV y posibles acciones de manejo inmediato que sean accesibles, económica y técnicamente, a pequeños y medianos productores.

Se recomienda el uso de variedades resistentes de frijol la concentración de la producción de tomate y frijol en épocas con clima desfavorable a la mosca blanca (frío), pues como se observó en el caso del frijol, las bajas poblaciones de mosca blanca no permitieron una alta incidencia de geminivirus (10%). Es importante recalcar que la siembra de estos cultivos en época de frío, además de que no se recomienda por la falta de lluvia, podría favorecer la presencia de otras enfermedades de etiología no viral como hongos, comprometiendo la producción.

Si se logra la introducción al mercado de las variedades israelíes en forma comercial, logrando así un precio de la semilla accesible a los productores de tomate de la región, se recomendaría la adopción del germoplasma, principalmente las variedades TY-198, TY-8479 y TY-8933 al presentar el mejor desempeño ante enfermedades causadas por geminivirus, especialmente TYLCV, y otras enfermedades de etiología no viral.

Iniciar programas de manejo de TYLCV a nivel Centroamericano, pues no se descartaría la posibilidad de la presencia de este virus en otros países de la región.

Si es factible económicamente, repetir el ensayo de desempeño del germoplasma de tomate resistente a infecciones virales a un nivel mayor para evitar los altos grados de variación que se observó en este experimento, provocado por el error experimental. Asimismo, realizar un mejor manejo de enfermedades fungosas y bacterianas que pueden interferir en el estudio.

Evaluar el germoplasma de tomate resistente a infecciones virales bajo condiciones de invernadero y prácticas agronómicas elaboradas para lograr determinar el verdadero potencial de producción en un medio ambiente que justifique el alto costo de su semilla.

Profundizar este estudio para determinar la presencia de otros agentes virales que no sean geminivirus y evaluar, de ser posible aisladamente, su efecto detrimental en estos cultivos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, P. 1998. Tomato Yellow Leaf Curl Begomovirus: Spreading. <http://www.agnic.org/pmp/1998/ty10528.html>
- BLANCARD, D. 1992. Enfermedades del Tomate. Trad. por Antonio Peña Iglesias. Madrid. Mundi-Prensa. 212 p.
- BOCK, K.R. 1974. Maize Streak Virus. Description of Plant Viruses. C.M.I., AAB, Feny Lane, Kew, England. No. 98.
- BOGRÁN, C.E.; OBRYCKIL, J.J.; CAVE, R. 1998. Assessment of Biological Control of *Bemisia tabaci* (Homoptera :Aleyrodidae) on Common Bean in Honduras. Florida Entomologist vol. 81 (3).
- BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G. 1995. VI th ICTV Report; Family *Geminiviridae*. [http://life.anu.edu.au/viruses/ictv/fs\\_gemini.htm](http://life.anu.edu.au/viruses/ictv/fs_gemini.htm)
- BROWN, J.K.; BIRD, J. 1992. Whitelfly-transmitted Geminivirus and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. Plant Disease 76 (3) :220-225.
- BROWN, J.K. 1993. Las Moscas Blancas (Homoptera :Aleyrodidae) en América Central y el Caribe: Evaluación Crítica sobre los Biotipos de Mosca Blanca en América, de 1989 a 1992. Trad. por B. Valverde. In Memoria del Taller Centroamericano y El Caribe sobre Moscas Blancas (1992, CATIE, C.R.). Ed. por Luko Hilje y Orlando Arboleda. CATIE, Turrialba, C.R. p. 10-15.
- BROWN, J.K.; WYATT, S.D. 1997. Geminidetective; Bean Golden Mosaic Virus. <http://ipmwww.ncsu.edu/cicp/GEMINI/descriptions/bgmv-br/bgmv-br.htm>  
<http://ipmwww.ncsu.edu/cicp/GEMINI/descriptions/bgmv-pr/BGMV-PR.html>
- BROWN, J.K. 1999. Biological, genetic, and molecular characterization of begomoviruses from Puerto Rico and the Caribbean Region. In Caribbean Division Meeting Abstracts (1999, San Juan, P.R.). s.n.t. p.107.
- BRUNT, A.A; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L.; ZURCHER, E.J. 1997. Plant viruses online; Description and lists from the VIDE database: Bean golden mosaic bigeminivirus. <http://www.biology.anu.edu/Groups/MES/vidе/descr070.htm>

\_\_\_\_\_. 1996. Plant viruses online; Descriptions and lists from the VIDE database: *Lycopersicon esculentum*. <http://biology.amu.edu.au/Groups/MES/vide>

\_\_\_\_\_. 1997. Plant viruses online; Description and lists from the VIDE database: Tomato yellow leaf curl bigeminivirus. <http://www.biology.amu.edu/Groups/MES/vide/descr840.htm>

BÜSCHEN-OSMOND, C. 1998. ICTV Data Base; Bean Golden Mosaic Virus. <http://ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/290300009.htm>

CABALLERO, R. 1993. Las Moscas Blancas (Homoptera :Aleyrodidae) en América Central y el Caribe : Moscas Blancas Neotropicales (Homoptera :Aleyrodidae) : Hospedantes, Distribución, Enemigos Naturales e Importancia Económica. In Memoria del Taller Centroamericano y El Caribe sobre Moscas Blancas (1992, CATIE, C.R.). Ed. por Luko Hilje y Orlando Arboleda. CATIE, Turrialba, C.R. p. 10-15.

\_\_\_\_\_. 1996. Identificación de Moscas Blancas. In Metodologías para el Estudio y Manejo de Moscas Blancas y Geminivirus. Ed. por Luko Hilje. CATIE, Unidad de Fitoprotección. Turrialba, C.R. p. 1-10.

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 1990. Guía para el Manejo Integrado de Plagas del Cultivo de Tomate. CATIE, Proyecto Regional MIP. Turrialba, Costa Rica, 138 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988. Principales Enfermedades Virales del Frijol en América Latina y su Control. Contenido científico: Morales y Castaño. Tercera Ed. Cali, Colombia. 36 p.

CZOSNEK, H.; LATERROT, H. 1997. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Virology* 142 :1391-1406. <http://indyccl.agri.huji.ac.il/~czosnek/findings.html>

DICTA (Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria). 1998. El cultivo de frijol. Guía para el manejo del cultivo del frijol. Tegucigalpa, Honduras, Zamorano Academic Press. 39 p.

DOYLE, M.M.; BARRIENTOS, E.; JACO, A.; TRABANINO, R.; CRUZ, K. 1999. Annual Report, IPM/Biotechnology Group, Bean/CowPea CRSP. Zamorano. 39 p.

ESPINOZA P., J.M. 1999. Comportamiento agronómico de fuentes de resistencia al virus del mosaico dorado en frijol común. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 35p.

GARCIA C., O. 1999. Evaluación del impacto de las enfermedades en hortalizas antes y después de la tormenta tropical "Mitch" en la Región del Yeguaré, Honduras. Zamorano, Honduras. 26p. Proyecto Unir-Zamorano.

HIEBERT, E.; POLSTON, J.E.; McGOVERN, R.J.; WEBB, S.E.; CHELLEMI, D.O. 1996. Identification, Biological Characterization and Management of Geminiviruses in Florida. <http://www.ifas.ufl.edu/~research/accountability/projects/03394.HTM>

HILJE, L. 1996. Metodologías para el Estudio y Manejo de Moscas Blancas y Geminivirus. CATIE, Unidad de Fitoprotección. Turrialba, C.R. 150 p.

HUGHES, K. 1999. Electrophoresis technique. <http://funnelweb.utcc.utk.edu/~khughes/GEL/sld001.htm>

IDRIS, A.M.; BIRD, J.; BROWN, J.K. 1999. *Macrottilium* mosaic begomovirus from Puerto Rico causes a golden mosaic disease of bean, but is distinct from bean golden mosaic begomovirus. *In* Caribbean Division Meeting Abstracts (1999, San Juan, P.R.). s.n.t. p.84

LASTRA, R. 1993. Las Moscas Blancas (Homoptera :Aleyrodidae) en América Central y el Caribe: Los geminivirus: un grupo de filovirus con características especiales. *In* Memoria del Taller Centroamericano y El Caribe sobre Moscas Blancas (1992, CATIE, C.R.). Ed. por Luko Hilje y Orlando Arboleda. CATIE, Turrialba, C.R. p. 16-19.

LITTLE, T.M.; JACKSON, F. 1976. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. México D.F, Trillas. 270 p.

MIKLAS, P.; JOHNSON, E.; BEAVER, J. 1998. \_\_\_\_\_. TEKTRAN, United States Department of Agriculture. <http://www.nal.usda.gov/tfic/tektran/data/000006/49/0000064934.html>

NAKHLA, M.K.; HRUSKA, A.J.; MAXWELL, D.P. 1998. Geminiviruses associated with tomatoes, beans and *Sida* spp. in Honduras. *In* 2<sup>nd</sup> International Workshop on *Bemisia* and Geminiviruses (1998, San Juan, Puerto Rico). s.n.t. p. 54.

POLSTON, J.E.; McGOVERN, R.J.; STANSLY, P.A. 1994. Tomato Yellow Leaf Curl Virus. <http://hammock.ifas.ufl.edu/new/pg08400.htm>

RAMÍREZ, P.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. 1996. Identificación de Geminivirus. *In* Metodologías para el Estudio y Manejo de Moscas Blancas y Geminivirus. Ed. por Luko Hilje. CATIE, Unidad de Fitoprotección. Turrialba, C.R. p. 30-41.

ROSAS, J.C. 1998. El cultivo del Frijol Común en América Tropical. Honduras, Zamorano Academic Press. 52p.

ROSAS, J.C.; VARELA, O.I.; BEAVER, J.S. 1997. Registration of 'Tío Canela-75' small red bean (Race Mesoamerica). *Crop Science* 37:1391.

ROSAS, J.C.; VARELA, O. 1996. Tío Canela 75. Zamorano, Honduras. 4p. Publicación AG-9606.

SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; CAMERO, R.; SORIA, C.; DIAZ, J.A.; MORIONES, E. 1999. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *The American Phytopathological Society*. s.n.t. 89(11):1038-1043. Publication no. P-1999-0907-01R.

SALGUERO, V. 1993. Las Moscas Blancas (Homoptera :Aleyrodidae) en América Central y el Caribe: Perspectivas para el manejo del complejo mosca blanca-virosis. In *Memoria del Taller Centroamericano y El Caribe sobre Moscas Blancas (1992, CATIE, C.R.)*. Ed. por Luko Hilje y Orlando Arboleda. CATIE, Turrialba, C.R. p. 20-26.

SPONAGEL, K.; FÚNEZ, M. 1994. Estrategias probadas del manejo del complejo fitosanitario Mosca Blanca/Virus Gemini en la producción de tomate. FHIA, La Lima, Honduras. 46 p.

SPRAYTEC. 1999. Bulletin; Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV). <http://www.spraytec.com/articles/tylcv/tylcv.htm>

STANSLY, P.A.; CONNER, J.M. 2000. Impact of Tomato Yellow Leaf Curl Virus on Tomato Yields in Southwest Florida. <http://valencia.lal.ufl.edu/jkbu/fshs/138.html>

STEEL, R.; TORRJE, J.H. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da Edición. México D.F, McGraw-Hill/Interamericana de México. 622 p.

VOYSEST, O. 1993. Variedades de Frijol en América Latina y su Origen. Cali, Colombia. CIAT. 87 p.

XIONG, Z. 2000. Single-stranded DNA Viruses: Geminiviruses. <http://ag.arizona.edu/~zxiong/plp611/lect17.html>

## 8. ANEXOS

## ANEXO 1

Extracción de ADN Total (Planta y Viral)  
Modificación de Doyle & Doyle (1990), FOCUS 12 (1): 13-15  
Extracción Miniprep de ADN

1. Anotar la información de la muestra.
  2. Pesar 0.01 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 macerar.
  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 100 uL de CTAB a 65°C con la arena (o una relación de tejido:buffer de 1:3-5).
  4. Mezclar bien y transferir con una micropipeta a un tubo microcentrífuga (1.5 mL).
  5. Adicionar 1 volumen (300 uL) de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), e invertir para mezclar.
  6. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min. Para separar las fases.
  7. Remover y transferir con micropipeta la fase superior acuosa a un nuevo tubo microcentrífuga. Descartar la capa orgánica de cloroformo en un recipiente.
  8. Adicionar 2/3 partes de volumen de isopropanol frío (almacenado en el freezer), cubrir con parafilm e invertir suavemente para mezclar (precipita los ácidos nucleicos). Incubar a temperatura ambiente por toda la noche.
  9. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min. (4°C). Cuidadosamente decantar el sobrenadante (el sedimento puede estar disuelto). Pipetear cualquier líquido remanente con micropipeta.
  10. Adicionar 100 uL de buffer frío de lavado directamente al sedimento (sustituye la sal de CTAB con sal de amonio), mezclar e incubar por 20 min. a temperatura ambiente.
  11. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min. (4°C).
- Nota: Si la muestra se observa sucia, se puede repetir el paso 10 al 11 (centrifugar).
12. 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.
  13. Resuspender el sedimento en 50 uL de agua destilada estéril. Almacenar a 4°C.

## Buffers

Buffer de Extracción de 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) | 12.1g   | 6.05 g  |

Disolver los reactivos en aproximadamente 1,7 L de agua destilada (850 ml si es para la mitad). Cuando disuelva, caliente hasta casi el punto de ebullición y 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 evaporación.

Buffer de lavado:

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
|                                 | 10 ml |
| 95% etanol (76%)                | 7.9   |
| 8 M NH <sub>4</sub> Oac (10 mM) | 1.2   |
| Agua destilada                  | 2     |

SINTOMAS Y RESULTADOS DE PCR PARA GEMINIVIRUS Y TYLCV PARA MUESTRAS DE TOMATE (MUESTREO ALEATORIO)

| MUESTRA   | ENANISMO | CORRUGAMIENTO | CLOROSIS | BORDES MORADOS | ACUCHARAMIENTO | GEMINIVIRUS | TYLCV |
|-----------|----------|---------------|----------|----------------|----------------|-------------|-------|
| PETO 08 1 | X        | X             | X        | X              |                | X           | X     |
| PETO 08 2 |          |               |          |                | X              |             |       |
| PETO 08 3 | X        | X             |          |                | X              |             |       |
| PETO 08 4 |          | X             | X        |                |                |             |       |
| PETO 08 5 | X        | X             | X        | X              |                |             |       |
| PETO 08 6 | X        | X             | X        |                |                |             |       |
| TY-197 1  |          | X             |          |                |                |             |       |
| TY-197 2  | X        |               |          |                |                |             |       |
| TY-197 3  |          | X             | X        |                | X              | X           | X     |
| TY-197 4  | X        |               |          |                |                |             |       |
| TY-197 5  |          |               |          |                |                |             |       |
| TY-197 6  |          |               |          |                |                |             |       |
| TY-198 1  |          |               |          |                | X              | X           | X     |
| TY-198 2  |          |               |          |                | X              | X           | X     |
| TY-198 3  |          |               | X        |                | X              | X           | X     |
| TY-198 4  |          |               |          |                | X              |             |       |
| TY-198 5  |          | X             |          |                |                |             |       |
| TY-198 6  |          |               |          |                | X              |             |       |
| TY-8479 1 | X        |               |          |                | X              | X           |       |
| TY-8479 2 |          | X             | X        |                | X              | X           | X     |
| TY-8479 3 |          | X             |          |                | X              | X           | X     |
| TY-8479 4 |          | X             | X        |                | X              |             |       |
| TY-8479 5 |          | X             | X        |                | X              | X           |       |
| TY-8479 6 |          | X             | X        |                | X              | X           |       |
| TY-8933 1 |          |               |          |                | X              | X           |       |
| TY-8933 2 |          |               |          |                | X              |             |       |
| TY-8933 3 |          |               |          |                | X              | X           |       |
| TY-8933 4 |          |               |          |                | X              |             |       |
| TY-8933 5 |          |               |          |                |                |             |       |
| TY-8933 6 |          | X             |          |                | X              | X           |       |

ANEXO 2

SINTOMAS Y RESULTADOS DE PCR PARA GEMINIVIRUS Y TYLCV PARA MUESTRAS DE TOMATE (MUESTREO POR SINTOMAS)

| MUESTRA    | NO. MUESTREO | ENANISMO | CORRUGAMIENTO | CLOROSIS | BORDES MORADOS | ACUCHARAMIENTO | GEMINIVIRUS | TYLCV |
|------------|--------------|----------|---------------|----------|----------------|----------------|-------------|-------|
| PETO 98 P1 | 1            | X        | X             |          | X              |                | X           |       |
| PETO 98 P2 | 1            | X        | X             |          | X              |                | X           |       |
| TY-197 P1  | 1            | X        |               | X        |                | X              | X           |       |
| TY-197 P2  | 1            |          |               | X        |                |                | X           |       |
| TY-186 P1  | 1            |          | X             |          |                |                | X           |       |
| TY-186 P2  | 1            |          |               | X        |                |                | X           |       |
| TY-8479 P1 | 1            | X        |               | X        |                |                | X           |       |
| TY-8479 P2 | 1            | X        |               |          |                | X              | X           |       |
| TY-8933 P1 | 1            |          |               |          |                | X              | X           |       |
| TY-8933 P2 | 1            |          |               |          |                | X              | X           |       |
| PETO 98 P1 | 2            | X        | X             |          | X              |                | X           |       |
| PETO 98 P2 | 2            | X        | X             |          | X              |                | X           |       |
| TY-197 P1  | 2            | X        |               | X        |                | X              | X           |       |
| TY-197 P2  | 2            |          |               | X        |                |                | X           |       |
| TY-186 P1  | 2            |          | X             |          |                |                | X           |       |
| TY-186 P2  | 2            |          |               | X        |                |                | X           |       |
| TY-8479 P1 | 2            | X        |               | X        |                |                | X           |       |
| TY-8479 P2 | 2            | X        |               |          |                | X              | X           |       |
| TY-8933 P1 | 2            |          |               |          |                | X              | X           |       |
| TY-8933 P2 | 2            |          |               |          |                | X              | X           |       |

SINTOMAS Y RESULTADOS DE PCR PARA GEMINIVIRUS Y VMDF PARA FRIJOL (MUESTREO POR SINTOMAS)

| MUESTRA     | CORRUGAMIENTO | AMPOLLAMIENTO | CLOROSIS | MOSAICO | ENANISMO | DEFORMACION | GEMINIVIRUS | VMDF |
|-------------|---------------|---------------|----------|---------|----------|-------------|-------------|------|
| B1 D46 P1   | X             | X             | X        |         |          |             |             |      |
| B2 D46 P1   |               | X             | X        |         |          | X           | X           | X    |
| B4 D46 P1   | X             | X             |          | X       |          | X           | X           | X    |
| B4 Od P1    | X             | X             |          |         |          | X           |             |      |
| B1 Cteh P1  | X             | X             |          |         |          | X           | X           | X    |
| B1 Tlo C P1 | X             | X             |          |         |          |             |             |      |
| B2 Tlo C P1 | X             | X             |          |         |          |             |             |      |
| B1 D6 P1    | X             | X             |          |         |          |             | X           | X    |
| B4 D3 P2    | X             | X             |          | X       |          |             |             |      |
| B1 Drr P1   | X             | X             |          |         |          |             | X           | X    |
| B1 Drr P2   | X             | X             | X        |         |          |             |             |      |
| B1 Drr P3   | X             | X             | X        |         |          |             | X           |      |
| B2 Drr P1   | X             | X             |          | X       |          |             |             |      |
| B2 Drr P2   | X             | X             |          | X       |          |             | X           | X    |
| B3 Drr P1   | X             | X             |          | X       |          |             |             |      |
| B3 Drr P2   |               |               | X        |         | X        | X           | X           | X    |

SINTOMAS Y RESULTADOS DE PCR PARA GEMINIVIRUS Y VMDF PARA FRIJOL (MUESTREO ALEATORIO)

| MUESTRA    | CORRUGAMIENTO | AMPOLLAMIENTO | CLOROSIS | MOSAICO | ENANISMO | DEFORMACION | GEMINIVIRUS | VMDF |
|------------|---------------|---------------|----------|---------|----------|-------------|-------------|------|
| B1 Tlo C 1 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 Tlo C 2 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 Tlo C 3 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 Tlo C 4 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 DS 1    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 DS 2    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 DS 3    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 DS 4    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 Ctch 1  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 Ctch 2  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 Ctch 3  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 Ctch 4  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 Drr 1   |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 Drr 2   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B1 Drr 3   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B1 Drr 4   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B1 D45 1   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B1 D45 2   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B1 D45 3   |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 D45 4   | X             |               |          |         | X        |             | X           |      |
| B1 D6 1    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 D6 2    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 D6 3    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B1 D6 4    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Tlo C 1 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Tlo C 2 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Tlo C 3 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Tlo C 4 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 DS 1    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 DS 2    |               |               |          |         |          |             |             |      |

| MUESTRA    | CORRUGAMIENTO | AMPOLLAMIENTO | CLOROSIS | MOSAICO | ENANISMO | DEFORMACION | GEMINIVIRUS | VMDF |
|------------|---------------|---------------|----------|---------|----------|-------------|-------------|------|
| B2 DS 3    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 DS 4    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Cteh 1  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Cteh 2  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Cteh 3  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Cteh 4  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Drr 1   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B2 Drr 2   | X             |               |          |         | X        |             | X           | X    |
| B2 Drr 3   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B2 Drr 4   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B2 D48 1   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B2 D48 2   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B2 D48 3   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B2 D48 4   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B2 Dd 1    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Dd 2    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Dd 3    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B2 Dd 4    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Tlo C 1 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Tlo C 2 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Tlo C 3 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Tlo C 4 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 DS 1    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 DS 2    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 DS 3    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 DS 4    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Cteh 1  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Cteh 2  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Cteh 3  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Cteh 4  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Drr 1   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B3 Drr 2   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |

| MUESTRA    | CORRUGAMIENTO | AMPOLLAMIENTO | CLOROSIS | MOSAICO | ENANISMO | DEFORMACION | GEMINIVIRUS | VMDF |
|------------|---------------|---------------|----------|---------|----------|-------------|-------------|------|
| B3 Drr 3   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B3 Drr 4   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B3 D45 1   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B3 D45 2   |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 D45 3   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B3 D45 4   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B3 Dd 1    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Dd 2    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Dd 3    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B3 Dd 4    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Tlo C 1 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Tlo C 2 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Tlo C 3 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Tlo C 4 |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 DS 1    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 DS 2    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 DS 3    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 DS 4    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Ctch 1  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Ctch 2  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Ctch 3  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Ctch 4  |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Drr 1   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B4 Drr 2   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B4 Drr 3   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B4 Drr 4   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B4 D45 1   | X             |               |          |         | X        |             | X           | X    |
| B4 D45 2   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B4 D45 3   | X             |               |          |         | X        |             |             |      |
| B4 D45 4   |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Dd 1    |               |               |          |         |          |             |             |      |
| B4 Dd 2    |               |               |          |         |          |             |             |      |

| MUESTRA | CORRUGAMIENTO | AMPOLLAMIENTO | CLOROSIS | MOSAICO | ENANISMO | DEFORMACION | GEMINIVIRUS | VIADF |
|---------|---------------|---------------|----------|---------|----------|-------------|-------------|-------|
| B4 Dd3  |               |               |          |         |          |             |             |       |
| B4 Dd4  |               |               |          |         |          |             |             |       |