



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

(UNA)

**DEPARTAMENTO DE PROTECCION AGRICOLA Y FORESTAL
(DPAF)**

Determinación del período de adquisición, inoculación y retención del geminivirus transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci Genn*) en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) en el valle de Sébaco.



Tesis presentada para optar al título de Ingeniero Agrónomo en la orientación de Sanidad Vegetal.

Karla Vanessa Zeledón Vallejos.

Asesor Ing. Aldo Rojas Solís.

Managua 19 de marzo/2002

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

(UNA)

INDICE

Contenido	
Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	6
Materiales y métodos.....	7
Fase de Invernadero.....	7
Fase de Laboratorio.....	8
Determinación del porcentaje de infectividad.....	8
Periodo de adquisición.....	9
Periodo de inoculación.....	9
Periodo de retención.....	10
Rango de hospedante.....	10
Extracción de ADN del tejido infestado.....	10
Amplificación de ADN, a través de la técnica PCR.....	11
Técnica de electroforesis.....	12
Resultados y discusión.....	13
Porcentaje de infectividad.....	13
Periodo de adquisición.....	13
Periodo de inoculación.....	16
Periodo de retención.....	19
Rango de hospedante.....	21
Conclusiones.....	23
Recomendaciones.....	24
Bibliografía.....	25
Anexo.....	29
Ciclo de vida de <i>Bemisia tabaci</i> Genn.....	29
Tomates con síntomas provocados por el geminivirus de Sébaco.....	20
Poblaciones de <i>B. tabaci</i> , en su estado ninfal en una hoja de tomate.....	30

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

(UNA)

A Dios, mis padres y amigos.

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

(UNA)

AGRADECIMIENTOS

A Dios quien me dio la energía necesaria para poder llegar al final de este proceso y quien orientó mis pasos, y que además me dio por Padre y Madre a una mujer digna de admirar, comprensiva, la que me enseñó a ver mis metas y mis fracasos como mi propio triunfo, la que me brindó su amor y su amistad incondicionalmente y sobre todo la que confió y apoyó mis decisiones, ella es la Sra. Mónica Vallejos, a la que hoy debo mi formación integral.

Pero también hoy extiendo mi agradecimientos a la viejita más linda del mundo, que no ha dejado de rogar al altísimo, por mi persona, ni un solo minuto de mi existencia, mi abuelita materna María Felipa Vallejos.

Agradezco de manera muy especial al Lic. Allan Báez, quien contribuyó con sus conocimientos a proyectar mis ideas y mi visión al futuro, quien a demás a considerado capacidades y me ha integrado al noble valor de la responsabilidad, elemento fundamental para el progreso de Nicaragua y el mundo.

A los señores Anders Kvarnheden y Jari P. T. Valkonen, del Departamento de biología de plantas, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) por haber contribuido en nuestra formación y con las de futuros profesionales, con la instalación del laboratorio de biología molecular en nuestra Alma Mater y que ha sido una herramienta fundamental en la elaboración de nuestro trabajo de investigación y que seguramente lo será para las generaciones futuras, programa PhD – UNA- SLU financiado por Sida-SAREC.

Al Ing. Aldo Rojas, quien no sólo nos asesoró en nuestro trabajo, sino también implementó con sus exigencias cualidades que demanda nuestro país para salir adelante (puntualidad, responsabilidad).

Al Sr. Jorge Hernández, al Ing. M Sc. Bryan Mendieta, al Dr. Victor Aguilar, lic. Ernesto Flores, quienes estuvieron apoyándome en mis labores en el transcurso de mi investigación.

I. INTRODUCCION

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es uno de los vegetales u hortalizas más importante del mundo y su popularidad aumenta constantemente. En el ámbito mundial, se clasifica como el segundo vegetal más importante superado únicamente por la papa. En el trópico es el número uno. En Nicaragua el tomate ocupa uno de los primeros lugares entre las hortalizas, tanto en consumo como en producción y comercialización. Los rendimientos promedios varían de 12 á 18 ton/ha. En el país actualmente se cultiva 2000 á 2500 ha, siendo las principales áreas de producción Matagalpa y Jinotega, particularmente en el valle de Sébaco y Tomatoya (INTA, 1999).

El tomate es susceptible a muchas plagas y enfermedades, sin embargo, varios sistemas agrícolas tropicales y subtropicales han sido severamente afectada por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn), (Homoptera –Aleyrodidae) que se ha convertido en la principal plaga agrícola mundial (Brown,1994) *B.tabaci* es un vector de geminivirus el más importante en el continente y en el mundo (Caballero, 1996).

B. tabaci oviposita generalmente en el envés de las hojas más jóvenes cada huevo puede estar o no cubierto de una secreción cerosa blanca y están adheridos a la hoja por un pedicelo. Pasa por cuatro estadios ninfales, (véase la fig. 1 del anexo) el primer estadio es móvil y se mueve hasta que encuentra un lugar apropiado para anclarse e iniciar su alimentación, los estadios ninfales segundo, tercero y cuarto se desarrollan anclados en el envés de las hojas, después de la tercera muda la ninfa pasa por dos fases, en la primera que corresponde al cuarto estadio ninfal, aún se alimenta, mientras que en la segunda deja de hacerlo, sufriendo algunos cambios morfológicos, el adulto recién emergido es de color amarillo pálido, pero después de 3-5 horas toman un color blanco característico, debido al polvo ceroso que los cubre. La cópula puede ocurrir unas dos horas después de la emergencia de los adultos (Salguero, 1990).

Las moscas blancas dañan las plantas de varias formas, causan daños directos al alimentarse individualmente succionando la savia lo cual puede traer como consecuencia clorosis y hasta la muerte. Otro daño directo se relaciona con la producción de extractos azucarados, sobre los cuales se desarrollan hongos, dañando la apariencia del producto y dificultándose la función clorofílica debido

al bloqueo de luz. Sin embargo, el daño más importante se debe a la transmisión de virus, específicamente los geminivirus (Perring et al 1991, Rosset 1988).

Se ha demostrado que la mosca blanca transmite seis virus pertenecientes a diferentes grupos: geminivirus, carlavirus, closterovirus, potyvirus, luteovirus, comovirus, siendo el grupo de los geminivirus el más importante (Duffus et al 1986) citado por Bonilla F. 1995.

Los geminivirus causan enfermedades muy importante en varios cultivos de las zonas tropicales y subtropicales. Están compuestos por ácido desoxirribonucleico (ADN) y una proteína que forma la cubierta. El nombre (gemini: gemelo) se debe a las estructuras de sus partículas, compuestas por dos cubiertas icosaédricas unidas por una de las caras, y estos pertenecen a la familia geminiviridae (Ramírez et al., 1996). El genoma esta constituido por una (virus monopartito) o dos (virus bipartito) moléculas de ADN. Estas moléculas son circulares y tienen una sola banda o cadena: solo durante la replicación se convierten en moléculas de doble cadenas.

El primer reporte que se tiene sobre a presencia de geminivirus en tomate en la región Centroamericana. Fue en el valle de Sébaco, Nicaragua, en 1983 (Rosset, 1986). En esta misma zona en 1986 se reporto una incidencia de geminivirus del 100% en las plantaciones de tomate. Estudios posteriores revelaron la presencia de geminivirus en Guatemala en 1988 (Dardon, 1993), el Salvador 1988 (Serrano et al., 1993), Costa Rica 1988 (Hilje, 1993) y Honduras 1989 (Caballero y Rueda, 1993).

De acuerdo a su estructura genómica, el vector que los transmite y los hospederos que infectan, la familia *Geminiviridae* está dividida en cuatro géneros: *Mastrevirus*, este género está constituido por geminivirus del viejo mundo, con un sólo componente genómico, los cuales infectan exclusivamente monocotiledóneas y son transmitidos por cicálidos (Mullineaux et al., 1984). El segundo género, *Curtovirus*, está formado por geminivirus distribuido en el Viejo y Nuevo Mundo, con un sólo componente genómico, infectan dicotiledóneas y son también transmitidos por cicálidos (Stanley et al., 1986). El tercer género: *Begomovirus*, formado por virus distribuidos en el Viejo y Nuevo Mundo, de uno o más componente genómico, sólo afectan dicotiledóneas y son transmitidos por mosquitas blancas (*Bemisia tabaci Genn*) incluyendo el biotipo B, también conocido como B.

argentifolii). El virus del enrollamiento de la hoja del tomate (TYLCV) (Navot et al.,1991), son begomovirus atípicos, ya que a pesar de ser transmitidos por mosquitas blancas, poseen genomas monopartitas. Estos geminivirus podrían ser intermediarios en la evolución entre los geminivirus monopartitas y los bipartitas. Recientemente se ha creado un cuarto género, como es el *Topocuvirus*. Todos citados por Rojas M. R., 2000.

La complejidad de la mosca blanca obedece a varios factores claves entre ellos gran plasticidad genética, lo que demuestra las siguientes evidencias: gran variación morfológica de las ninfas, incluso dentro de una misma planta, capacidad para desarrollar resistencia a los insecticidas, existencias de varias razas o biotipos (Brown 1990, Brown y Bird 1992; citado por Hilje, 1996).

El insecto tiene muchos biotipos siete de los cuales están en América Central y el Caribe (Brown et al.1995,). Es necesario investigar más sobre los biotipos de *B.tabaci*, dada la implementación epidemiológica que tiene el hecho de que el biotipo B de *B.tabaci* tenga un rango más amplio de plantas hospederas (Brown,1993). Información reciente derivada de una identificación molecular realizada en el CIAT con muestras proveniente del valle de Sébaco, Matagalpa indica que los especímenes recolectados no pertenecen al biotipo B (Sediles 2000, datos no publicado).

La relación del complejo mosca blanca-geminivirus se da a través de la relación virus -vector, mediante los siguientes periodos:

Periodo de inoculación que es el tiempo mínimo necesario que la mosca necesita alimentarse para transmitir el virus a una planta sana.

Periodo de adquisición es el tiempo mínimo de alimentación que *B.tabaci* necesita para adquirir el virus en una planta infestada.

Periodo de retención que es el tiempo máximo que la mosca permanece infectiva después de haber adquirido el geminivirus de una planta enferma.

La detección de los geminivirus es importante para el manejo de las enfermedades que ocasionan, y pueden hacerse detectando la proteína de su cápside o su genoma.

En el área de Mesoamérica y el Caribe el diagnóstico es más complejo, porque a menudo coexisten varios geminivirus en una misma planta.

Como se puede apreciar es necesario considerar la alta patogenicidad de los geminivirus y las pérdidas que éstos ocasionan a los productores del cultivo del tomate. Por tal razón consideramos que esta información servirá como bases a futuras investigaciones, tomando en cuenta el estudio bioecológico del problema y que actualmente la mayoría de los estudios epidemiológicos en plantas se realizan en el ámbito molecular, y todos ellos involucran de una u otra manera la detección de fitopatogenos por PCR. Por ello, la presente investigación surge además con el propósito de ensayar, en un cultivo de importancia económica como es el tomate, un protocolo de PCR, para la detección de geminivirus transmitido por la mosca blanca; para luego ser implementado en el diagnóstico molecular y aplicada a otros cultivos en estudios posteriores.

Resumen

El objetivo del presente trabajo consistió en la caracterización biológica de un geminivirus que afectó el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). El estudio se realizó en la Universidad Nacional Agraria (UNA), en el periodo de enero 2001- enero del 2002.

Esta investigación se realizó en tres fases: la primera de invernadero, donde se cultivaron plantas de tomate de la variedad UC-82, se improvisó una cría de moscas blancas (*Bemisia tabaci* Genn) vector del geminivirus en estudio y donde se estuvo reproduciendo el geminivirus de Sébaco en las plantas de tomate de la variedad ya mencionada, que servirían posteriormente como fuente de inóculo, esto se hizo por medio de injertos e inoculaciones, con el propósito de caracterizarlo biológicamente determinando los periodos de adquisición, inoculación, retención así como el rango de hospedero. Para este estudio se determinó además el porcentaje de infectividad de las colonias de moscas blancas, el cual fue de 66.6%, lo que indicó que se necesitaban cinco moscas por tratamiento, ya que estas garantizarían que al menos tres de ellas serían portadoras del geminivirus una vez que han adquirido el virus de la fuente de inóculo. Los tratamientos consistían en los diferentes tiempos expresados en horas como 0.08, 0.16, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 18, 24, 48, h con tres repeticiones para cada uno de ellos.

La fase de laboratorio de vectores consistió en llevar a cabo prácticamente los periodos de adquisición, inoculación y retención, los cuales dieron como resultados que *B.tabaci* necesita alimentarse de una planta infestada tan sólo 0.16 h que es equivalente a 10 minutos para adquirir el virus y que necesita un mismo tiempo para transmitirlo una vez que se ha alimentado en una planta sana. Respecto al periodo de retención el vector es capaz de retener las partículas virales hasta un séptimo día y que a medida que pasan los días la capacidad de transmisión disminuye.

En el estudio era también objetivo conocer cual era el rango de hospedante que tenía el geminivirus de Sébaco, por lo que se evaluaron 5 especies de la familia Solanácea, injertándolas con plantas infestadas del cultivo del tomate, resultando la especie *Nicotiana tabacum* cv *Benthamiana* con síntomas del virus. La última fase se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular donde se analizó a través de la técnica de PCR la presencia y ausencia de geminivirus en las plantas con las que se estuvo trabajando en el transcurso de la investigación.

Finalmente los resultados obtenidos en los diferentes periodos fueron analizados mediante un análisis de Regresión Logística Binaria, ya que los datos eran categóricos, es decir, cuyas respuestas son de sí

o no en otras palabras presencia o ausencia del geminivirus, donde la presencia era igual a uno y la ausencia de este mismo igual a cero.

I. OBJETIVOS

Objetivo General

1. Caracterizar biológicamente un geminivirus transmitido por la mosca blanca en el cultivo del tomate del valle de Sébaco para conocer su diversidad biológica y contribuir con nuestra información a diseñar nuevas estrategias de manejo.

Objetivos específicos

1. Determinar el tiempo mínimo de alimentación que la mosca blanca necesita para adquirir el virus en una planta infestada.

2. Conocer el tiempo máximo de retención que la mosca blanca permanece infectiva después de un periodo adquisitivo en una planta enferma.

3. Determinar el tiempo mínimo de alimentación que el vector necesita para transmitir el virus a una planta sana.

4. Conocer el rango de hospedero que el geminivirus tiene en plantas tanto inoculadas a través de su vector como por injerto.

II. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en la Universidad Nacional Agraria (UNA) ubicada en el Km. 12 ½ carretera norte Managua, específicamente en los invernaderos del Departamento de Protección Agrícola y Forestal, así como en el laboratorio de vectores y el laboratorio de Biología Molecular ubicados en la institución antes mencionada.

Se hizo con el propósito de determinar los periodos de adquisición, inoculación y retención, como se mencionó anteriormente en los objetivos.

La investigación se desarrolló en fases, una de invernadero y otra de laboratorio.

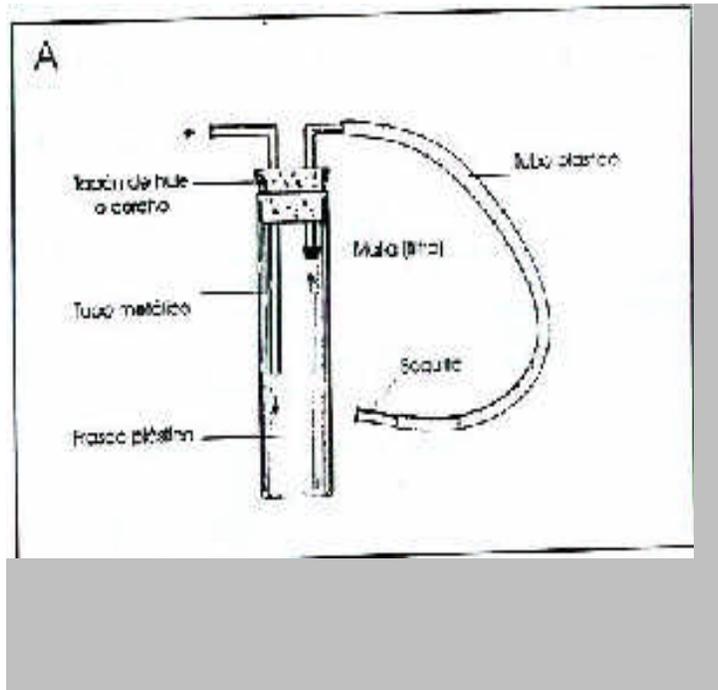
III. FASE DE INVERNADERO

3.1 Cría de moscas blancas

Se establecieron crías de moscas blancas dentro del invernadero y fuera de éste, para lo cual usamos jaulas de madera forradas con mallas finas, con el fin de no dejar que penetraran otros insectos que alteraran el proceso de desarrollo de las moscas.

Las moscas se extrajeron del campo, de cultivos de ayote y de pepino, de una finca ubicada en “El RODEO” cerca de las instalaciones de la universidad. Estas moscas se capturaron con succionadores (véase la figura 1) y posteriormente se trasladaron y se introdujeron en pequeñas jaulas de maya, las que contenían macetas con plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de la variedad DOOR 3 64 siendo este cultivo hospedero principal de la mosca blanca, para que alcanzaran grandes poblaciones, y para esto era necesario proporcionarles las condiciones óptimas como luminosidad suficiente si estaban en el campo o un techo de plástico grueso en caso de lluvias. Las moscas con las que se trabajó eran generaciones nuevas, libres de virus.

Fig. 1 Succionador con el que se capturaban las moscas blancas



3.2 Fuente de virus

En el caso de las fuentes de virus se trabajó con plantas infestada por un geminivirus transmitidos *B.tabaci* (Genn) del valle de Sébaco. Este geminivirus fue identificado como el geminivirus relacionado al virus del enrollamiento de la hoja del tomate Sinaloa (STLCV) por (Rojas et al., 2000) en la Universidad de Ciencias Agrícola (SLU) Upsala, Suecia.

Las fuentes de inóculo se mantuvieron en plantas de tomates de la variedad UC-82 a través de inoculaciones e injertos, a demás se les realizaban prácticas fitosanitarias como podas, así como labores de fertilización, se le aplicó NPK liquido a razón de 2.5 cc por litro de agua.

Composición química del NPK

Nitrógeno (N)	11.00%
Fósforo (P ₂ O ₅)	13.00%
Potasio (K ₂ O)	18.00%
Ingredientes Inertes	58.00%
Total	100.00%

Semanalmente se hicieron siembras de plantas de tomate y fríjol, la primera se hizo en bandejas y su posterior trasplante en maceteras, y la siembra de fríjol directamente en las maceteras, con el objetivo de tener disponible alimento para la cría de mosca blanca, y para mantener al geminivirus en estudio, esto último lo conseguíamos a través de injertos o inoculaciones.

IV. FASE DE LABORATORIO DE VECTORES

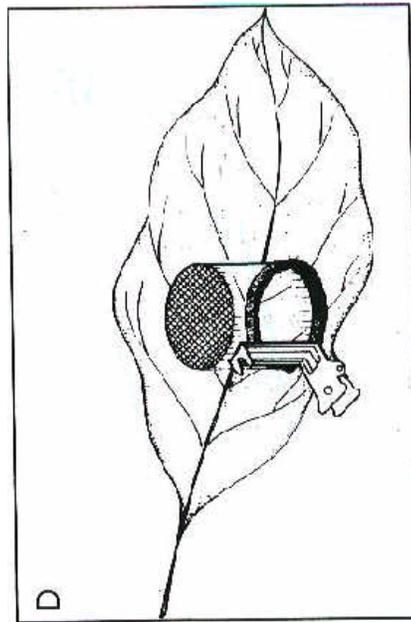
Relación virus –vector

4.1 Porcentaje de infectividad

Se necesitaba determinar el número de moscas que se iban a utilizar en los diferentes tratamientos (horas de alimentación de las moscas 0.08, 0.16, 30, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 18, 24, 48) y para esto se tomo de la cría de moscas blancas 20 mosquitas, se alimentaron de la fuente de virus, en este caso una planta de tomate, por un periodo de 48 horas, luego las pasamos a 20 plantas de tomate, colocando 1 mosca por planta en pequeñas trampitas de clip, (véase Fig. 2) y después de 24 horas las retiramos. Los resultados se obtuvieron después de 22 días de inocularlas. Este proceso se repitió 3 veces, para disminuir el margen de error.

Los resultados demostraron que 5 moscas blancas por plantas eran capaces de transmitir al geminivirus.

Fig. 2. ejemplo del uso de las trampas con clip en las hojas de tomate.



4.2 Periodo de adquisición:

De la cría se extrajeron 360 moscas blancas en realidad sólo se necesitaban 300, pero al manipularlas algunas morían, por lo que se ponían 30 moscas blancas, para garantizar las 25 que se necesitaban por cada tratamiento, estas se ponían a alimentar en plantas infestadas con el geminivirus de Sébaco por periodos de (0.08, 0.16, 1/2, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 18, 24, 48, horas) siendo estos los tratamientos antes mencionados. Luego se retiraron y se colocaron nuevamente en trampas de clip en grupos de cinco mosquitas por planta sanas de tomate, por un periodo de 24 horas, después de este lapso se vuelven a retirar y se eliminan dichas moscas, y tales plantas se llevan al invernadero con el fin de chequearlas de manera visual después de dos a tres semanas, que es el tiempo aproximado para visualizar los síntomas. Para saber con exactitud cuando aparecían los síntomas, se observaban todos los días.

Cabe mencionar que las plantas infestadas de las cuales se alimentaban inicialmente las moscas para adquirir el virus ya habían sido analizadas en el laboratorio de biología molecular para garantizar la presencia del geminivirus. Las plantas sanas las cuales se inocularon tenían una edad de 14 días después del trasplante.

4.3 Periodo de inoculación

Con el objetivo de conocer el tiempo mínimo de alimentación que *B.tabaci* necesita para transmitir el virus, se tomaron 360 moscas del criadero y se pusieron a alimentar colocándolas en unas trampita en plantas infectadas con el geminivirus en estudio por un periodo de 48 horas, cada trampita contenía 30 mosquitas. De cada trampa se extrajeron 25 moscas después de haber adquirido el virus en el tiempo antes mencionado, y las pusimos a alimentar por un periodo de tiempo de 0.08, 0.16, 1/2, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 18, 24 y 48 horas. Estos periodos eran los tratamientos y por cada uno de ellos utilizamos cinco plantas sanas de tomate, en las que pusimos a alimentar 5 moscas por plantas, que anteriormente ya habían adquirido el virus. Luego de alimentarse en los tiempos mencionados, las retiramos nuevamente y eliminamos las mosquitas. Posteriormente trasladamos las plantitas al invernadero para chequearlas diariamente y registrar las fechas de aparición de síntomas.

4.4 Periodo de retención

Se extrajeron 25 moscas blancas de la cría se pusieron a adquirir el virus durante 48 horas en una planta infestada, luego las pasamos a 20 plantas de tomate colocando una mosca en su respectiva trampa, de manera que se dejaron alimentándose por 24 horas, después de este tiempo se retiraron y estas mismas moscas se pasaron a nuevas plantas de tomate por otras 24 horas manteniendo la misma población de una mosquita por planta. El proceso se repitió hasta que las moscas murieron.

La toma de datos se realizaron en el invernadero.

4.5 Rango de hospedantes

Bajo condiciones del invernadero también se comprobó que el geminivirus en estudio podían infectar a través de injertos no sólo a la planta del tomate, sino que estos tienen un amplio rango de hospedante ya que pudieron replicarse en otros cultivos como chiltoma (chile dulce), tabaco, usando plantas (Nicotiana tabacum var. samsun) y (Nicotiana tabacum var. Venthamiana), así como Nicotiana physaloides las que posteriormente se analizaron a través de la técnica del PCR y la técnica de electroforesis, técnicas que posteriormente se describirán.

Los datos obtenidos al culminar la investigación fueron sometidos a un análisis de Regresión Logística Binaria, ya que este método permite analizar datos cuyas respuestas son de sí o no, en nuestro caso presencia y ausencia del geminivirus.

V. FASE DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las plantas inoculadas e injertadas se probaron con el fin de saber si los síntomas eran provocados realmente por geminivirus transmitido por la mosca blanca. De ahí los siguientes pasos.

5.1 Extracción de ADN del tejido infestado (Wyatt and Brown, 1996)

Procedimientos

Se colectó las muestras del aislado de Sábaco que presentaban síntomas, una cantidad aproximadamente 0.2 gramos de tejido de los brotes nuevo.

A cada muestra se le agregó 200µl de buffer de extracción (10mM EDTA+50mM Tris), el primero inhibe la acción de enzimas, y el Tris evita cambios de pH.

Se maceró cada muestra en bolsas especiales con el objetivo de desintegrar la pared celular del material vegetal, y se extrajo de cada muestra 150µl de savia y se depositó en los tubos eppendorf. Luego se centrifugó por 10 minutos a 9,000 rpm, para lograr la sedimentación de las proteínas y restos celulares, para su eliminación. En general se recomienda trabajar con tejido joven como hojas en crecimientos, el cual proporciona los mejores resultados (Hoelzel, 1998).

Posteriormente tomamos 50µl para añadirlos a los tubos PCR, los que dejamos incubando por 30 minutos en hielo con el objeto de sedimentar en las paredes del tubo ADN. Luego se retiró la muestra de los tubos PCR y se lavaron 2 veces con 200 µl de Tris (50mM) por cada lavada y se dejaron secar en papel absorbente, por un periodo de 30 á 45 minutos aproximadamente.

Comentario [AB1]:

5.2 Amplificación del ADN a través de la técnica de PCR, en un termociclador (PROGENE)

La duplicación del ADN se logra fácilmente en el laboratorio mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (conocida como PCR, por sus siglas en ingles). Para comenzar la polimerización, la polimerasa generalmente necesitan los iniciadores (“primers”), que son pequeños fragmentos de ADN complementarios a cierta región de la plantilla.

El método consiste en un proceso cíclico, mediante el cual se generan muchas copias de una molécula de ADN en presencia de un ADN polimerasa termoestable (taq polimerasa). Se sintetizan dos iniciadores, cada uno complementario de una pequeña secuencia de una de las bandas del ADN que se va amplificar. Los iniciadores corresponden a los extremos de las secuencias que se quiere amplificar. Las moléculas del ADN se desnaturaliza por calentamiento y después se enfría, junto con el exceso de iniciadores sintéticos y otras sustancias. El proceso se repite automáticamente 25 a 40 veces (ciclos), generalmente durante varias horas en un aparato denominado termociclador . De ello resultan ADN amplificado, es decir muchas copias exactas del mismo segmento.

Los componentes para llevar a cabo la amplificación:

Buffer 10xReaccion Buffer con MgCl, dNTPs mix 25mM, Primers, que sirven para cortar el AND en sitios específicos previamente determinados, Agua.

Para una muestra, con un volumen de 50µl necesitábamos.

- a) 25 µl de solución kit Ready PCR mix
- b) 2.5 µl primer Av
- c) 2.5 µl primers AC
- d) 20 µl de agua

Es de vital importancia señalar que siempre se usaba guantes para manipular estas reacciones en tubos PCR, ya que era posible contaminar las muestras con el ADN del cuerpo del investigador.

El programa PCR utilizado consta de 37 ciclos y es el siguiente

Procesos	Grados Celsius	Periodos
naturalización inicial	94	1m
naturalización	94	2m
ngación	55	2m
nsión final	72	10m

5.3 Técnica de electroforesis

El término electroforesis alude a la migración de moléculas en un campo eléctrico. Para usar esta técnica se colocó un gel de agarosa al 1%, esta agarosa se prepara de la siguiente manera.

Se pesó la agarosa 2.0g y se mezcló en 200 mL del buffer 0.5 X TBE se sometió a calor en el microondas (4 minutos) y luego se dejó enfriar, se le añadió 15µl de bromuro de etidium, se colocó en un molde, el cual contenía peines ubicados de manera horizontal, para dividir el gel y delimitar los carriles o pozos, y después de solidificarse a temperatura ambiente, se le añadió un poco más de TBE, con el objetivo de sacar los peines. Enseguida se ubicó el gel en una cámara de electroforesis, a 100 voltios, se le añadió buffer TBE hasta tapan el gel. Para que los orificios fueran visibles, se colocó un papel de color negro en la parte de abajo de la cámara y en cada uno se añadió 5µl de producto de PCR más 1 µl de loding buffer = 6µl por cada pozo, este ultimo es de color violeta y sirve para visualizar el ADN una vez mezclado, como regla en el primer orificio poníamos un marcador (Lambda DNA/Hind III Marker) con peso molecular conocido y en los orificios restantes las diferentes muestras, luego aplicamos una corriente eléctrica, durante una hora en los extremos, lo que generó un campo eléctrico en el gel. Como el ADN tiene carga negativa, los fragmentos se desplazan hacia el polo positivo ya que el TBE tiene una carga positiva, a diferentes velocidades según su peso y carga neta. Para la visualización de las bandas se usa una lámpara ultravioleta y finalmente se toma la foto.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Porcentaje de infectividad

Las colonias con las que se trabajó tenían un porcentaje de infectividad de 66.6%, esto indica que de 100 moscas blancas sólo el 66.6 % eran portadoras de virus y que el 34.4% podrían ser moscas sanas.

De ahí, la decisión de tomar 5 moscas para garantizar la efectividad de nuestro estudio ya que con éstas garantizamos que al menos 3 de ellas sean portadoras.

6.2 Periodo de adquisición

De acuerdo a la tabla 1 en todos los tratamientos hubo adquisición, a excepción del tratamiento 1 el cual corresponde al periodo de alimentación de 0.08 horas, que es igual a 5 minutos. La mosca blanca necesita alimentarse, para adquirir el virus de una planta infestada un mínimo de 0.16 horas, equivalente a 10 minutos. Por tanto, el periodo de adquisición determinado en este estudio fue de 10 minutos.

Como se podrá observar el geminivirus relacionado al virus del enrollamiento de la hoja del tomate sinaloa (STLCV) tiene mayor eficiencia una vez adquirido por su vector en los tratamientos 3 (0.5 horas) con un porcentaje de transmisión de 66% y el tratamiento 10 (18 horas) con un mismo porcentaje de transmisión que el tratamiento antes mencionado (66%).

Según Uzcategui y Lastra 1977) citado por Lastra en 1992, el adulto puede adquirir el virus de una planta enferma al alimentarse por 4 horas, como sucede con el virus del mosaico amarillo del tomate. Sin embargo, estos resultados indican que el vector es capaz de adquirir el virus en menor tiempo, en este caso 0.16, 0.5 horas.

Tabla 1 Porcentaje de transmisión de la mosca blanca en el cultivo del tomate, después de un periodo adquisitivo, UNA 2001.

Tratamientos/ periodos adquisiti en horas	Plantas con síntom 15 plantas / tratamiento	% de transmisio
0.08	0	0
0.16	5	33
0.50	10	66
1	4	26
2	6	40
4	9	60
8	6	40
10	8	53
12	9	60
18	10	66
24	9	60
48	5	33

Morales en 1993 afirma que *B. tabaci* requiere un mínimo de 10 minutos para adquirir el virus, lo que concuerda con los datos de este trabajo. Sin embargo Lastra en 1993, al igual que Bonilla, F, 1995 encontraron periodos de adquisición de 4 horas.

Estos resultados van a variar en diferentes experimentos, debido a que no todos los geminivirus son iguales, ni todos tienen una misma población en cuanto al vector se refiera. En esta investigación el geminivirus es específico así como las colonias de moscas con la que se trabajó.

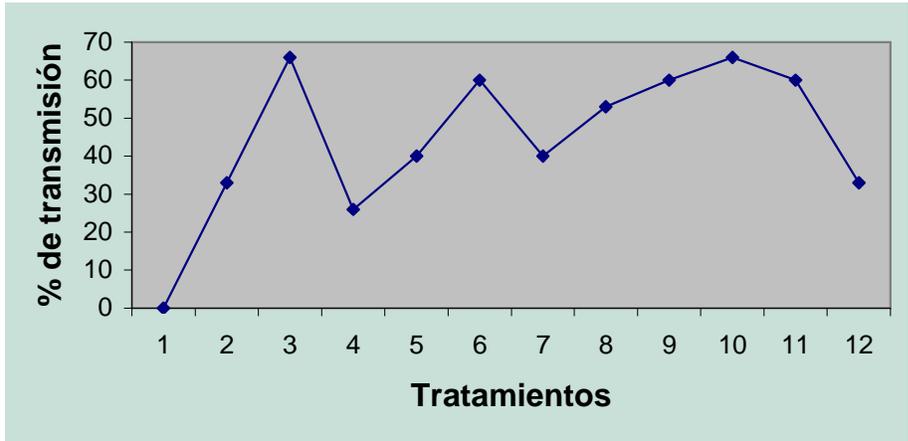
Idris et al., 1998 señala que el periodo de adquisición de la mosca blanca para adquirir (STLCV), falló en un periodo de 0.5 horas, habiendo resultados positivos para los periodos de 1, 2, 4, 10, 12, y 18 horas. Como se mencionó anteriormente el geminivirus de Sébaco está relacionado en un 95% con el virus (STLCV), probablemente los resultados de dichos trabajos no coinciden a pesar de su

relación, por la evolución y el desarrollo de nuevos biotipos que han tenidos los vectores en estos últimos años.

Como se puede apreciar en la tabla 1 de la pagina anterior, estadísticamente no existe significancia estadística entre los tratamientos, esto se traduce que una mosca que adquirió el virus por 10 minutos va tener la misma capacidad de transmitirlo que la mosca que lo adquirió en 0.50, 1, 2 48 horas.

Biológicamente estos resultados indican que no hay una relación entre el tiempo de alimentación y la transmisión de virus. Es lógico suponer que a mayor tiempo de exposición a la mosca con las plantas infestadas, haya una mayor efectividad para adquirirlo, sin embargo la figura 3 demuestra más claramente que no es así, y demuestran que una vez que adquirió el virus, va tener la misma capacidad de transmitirlo, que las moscas que lo adquirieron en un tiempo mayor, sin embargo varía la efectividad de hacerlo, ya que se observan las variaciones en la eficiencia de transmisión. Debido a factores como la elección al azar del vector, está comprobado que la hembra de la mosca blanca son más eficientes en la transmisión de geminivirus, parece lógico la explicación que esto se deba a la mayor actividad metabólica que la hembra realiza debido a la producción de huevos, esto hace que la toma de alimento de la hembra sea en mayor grado con respecto al macho, adquiriendo y liberando grandes cantidades de virus (Costa y Bennet, 1950). Por otro lado no existe un método de manipulación donde podamos obligar a la mosquita alimentarse una vez que está en el envés de la hoja. Otro factor que no se debe obviar es la edad de la mosquita, ya que su edad es inversamente proporcional a la de la transmisión, es decir, a menor edad mayor capacidad para transmitir el virus y viceversa.

La Figura 3: Periodo de adquisición del geminivirus en estudio en los diferentes tratamientos, UNA 2001.



Los picos que señala la figura 3 corresponden a los tratamientos 3 y 10 en estos tiempos se logró la mayor eficiencia de transmisión, se puede observar a demás que no es una transmisión con crecimiento logarítmico, si no que existen en las variaciones altos y bajos, debido a las fluctuaciones entre los tratamientos.

6.3 Periodo de inoculación

Como se podrá observar en 2 hubo transmisión del geminivirus en los diferente tratamientos excepto en el tratamiento cinco, que corresponde al periodo de inoculación de 0.08 horas equivalente a cinco minutos, como se puede apreciar también en la tabla, los periodos de mayor eficiencia de transmisión corresponden a los tratamientos seis y siete con un porcentaje de efectividad de 66.6%. Sin embargo, el periodo de inoculación determinado en este estudio es de 10 minutos, que es igual a 0.16 horas. Morales (1993) considera que la transmisión de geminivirus puede realizarse en menor tiempo que su periodo de adquisición una vez superado el periodo de latencia (21 horas); sin embargo, el cuadro 2 refleja que el geminivirus de sébaco tiene un periodo de inoculación igual al periodo adquisitivo de la mosca, (10 minutos)

Tabla 2: Porcentaje de transmisión del geminivirus de Sébaco en el cultivo del tomate, después de un periodo de inoculación.

tratamientos / período de inoculación en horas	plantas con síntomas por tratamiento	% de transmisión
0.08	0	0
0.16	1	6.6
0.50	5	33.3
1	7	46.6
2	7	46.6
4	10	66.6
8	10	66.6
10	6	40
12	2	13.3
18	7	46.6
24	9	60
48	7	46.6

Los datos demuestran que la mosca necesita más de 0.08 h para adquirir el virus.

Idris et al., al 1998, la mosca no es capaz de transmitir el (STLCV) en 0.5 h, pero que después de 24 h de adquisición, es capaz de transmitirlo por un periodo de 1, 2, 4, 10, 12 y 18 horas. Según la tabla 2 el tratamiento 3, que corresponde a 0.5 horas, la mosca blanca transmitió con eficiencia el geminivirus en estudio, estos resultados difieren de los datos mencionados anteriormente, aún estudiando un geminivirus estrechamente relacionado. Por otro lado estos resultados coinciden en parte con tales datos, ya que el vector una vez que adquirió el virus es capaz de transmitirlo por un periodo de 18 hasta 48 horas.

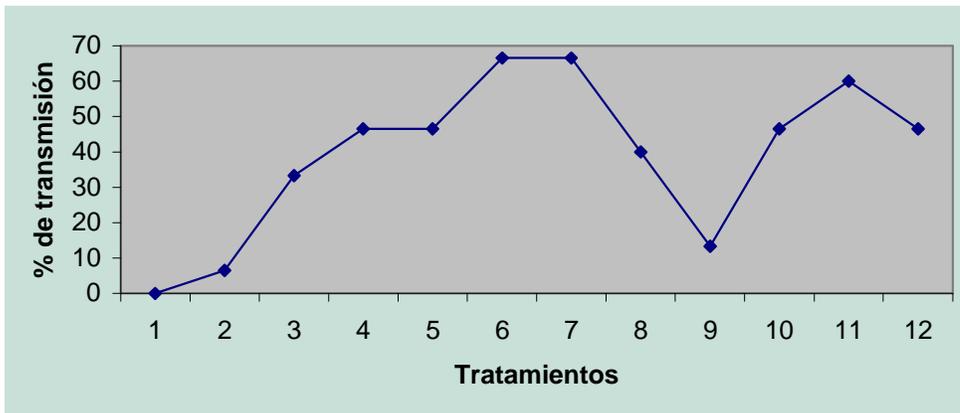
Se ha comprobado que a medida que pasa el tiempo y se buscan alternativas para la solución del problema mosca blanca-geminivirus, se incrementan las habilidades que este insecto vector puede desarrollar, en el tiempo.

Al comparar los datos (tabla 2), con los resultados del geminivirus de Condega, estudiado por Marcenaro y Rayo (2002) y con los resultados del geminivirus de Santa Lucía, estudiado por Salinas

2002, existe semejanza ya que ellas también determinaron un periodo de inoculación de 10 minutos, encontrando a demás variabilidad entre sus tratamientos.

Según los resultados obtenidos en este proceso de inoculación, no existe significancia estadísticamente. Esto puede ocurrir en una población controlada, pero en condiciones naturales las poblaciones exageradas provenientes de cultivos aledaños, marcan un total de pérdida de un 100%, ya que puede haber un asocio de geminivirus transmitidos por moscas blancas, tomando en cuenta que en el campo se conjugan diferentes poblaciones que provienen de campo infectado.

Figura 4: Efectividad de la Transmisión



Como se puede ver el comportamiento de la infección varió, según los tratamientos.

Los picos representan la mayor efectividad de los tratamientos, los cuales se obtuvieron en los tratamientos 6 y 7, que corresponden a los periodos de inoculación de 4 y 8 horas.

6.4 Periodo de Retención

De acuerdo a la tabla 3 el geminivirus de Sébaco, una vez que adquirió el geminivirus, las concentraciones de éste empiezan a bajar a medida que lo va transmitiendo, destacando un tiempo máximo en el que la mosca blanca aún permanece infectiva en el séptimo día, por tanto, la mosca fue capaz de retener el virus al séptimo día. Estos resultados coinciden con los resultados de Uzcategui y

Lastra en 1977 donde determinaron un periodo de retención de 7 días. Sin embargo, estos mismos señores en 1978 afirmaron que la mosca blanca estaba en capacidad de transmitir los geminivirus en forma intermitente por un periodo de 10 hasta 21 días en casos excepcionales.

Idris y Brown, 1998 afirmaron que el STLCV puede retener las partículas virales por 9 días. Este dato se aproxima a los resultados obtenidos en esta investigación.

De acuerdo al virus y la temperatura ambiental, la mosca está en capacidad de transmitir los geminivirus por un período de 10 días, ó 20 días en casos excepcionales (Lastra, 1992).

Según Bonilla, 1995 las plantas bajo condiciones de invernadero una vez infectadas, los síntomas virales generalmente son más leves, pues las condiciones climáticas son más benignas que el campo, está condición es válida para nuestro trabajo; ya que todos los estudios se llevaron a cabo en las condiciones de invernadero.

Tabla 3: Porcentaje de infectividad que la mosca blanca transmite por cada día que pasa, después de un periodo adquisitivo de 48 horas.

Plantas con sínt. I rép	Plantas con sínt. II rép	Plantas con sínt. III réplica	Total de plantas con síntomas	Porcentaje de infectividad.
16	11	16	43	71.5
9	13	3	25	41.5
6	9	4	19	31.5
5	4	2	11	18.3
2	2	1	5	8.3
1	0	1	2	3.3
0	0	1	1	1.6
0	0	0	0	0

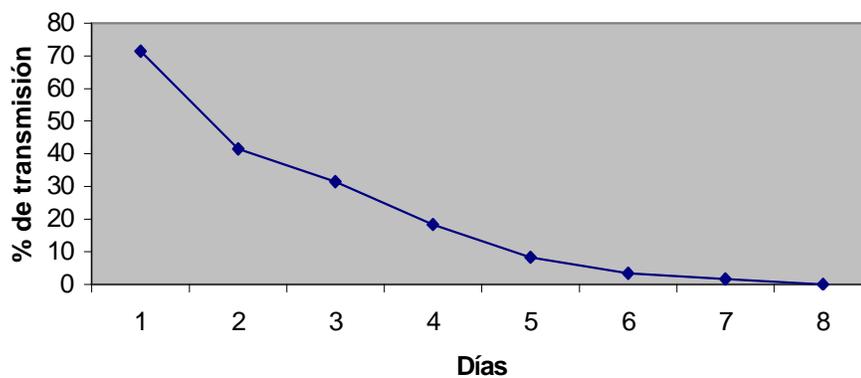
Por otro lado Morales, 1993 afirma que el insecto vector puede portar el virus hasta por 3 semanas, lo cual clasifica a los geminivirus como persistente, o semi-persistente cuando *Bemisia tabaci* pierde su capacidad de transmitir el virus a los pocos días de adquirirlos.

Bonilla, F. 1995 La mosca blanca fue capaz de transmitir la enfermedad del mosaico amarillo del tomate en forma semipersistente circulativa, siendo capaz de retenerlo hasta el décimotercer día. Una

características de las mayorías de los geminivirus es la inconsistencia de su patrón de transmisión, pues después de inoculaciones sucesivas exitosas, el vector puede fallar al transmitir, pero recuperar su habilidad para hacerlo después (Bock, 1982). En esta investigación como lo indica la figura 3 existe descenso en la transmisión a medida que pasa el tiempo, debido entre otras causas a la variación en la edad de los adultos, así como en la eficiencia de la transmisión.

Biológicamente la mosca después de un periodo adquisitivo de 48 horas, tuvieron capacidad de transmitir el virus por una semana, esto indica que no hay en ella multiplicación de las partículas virales comprobando su transmisión de semi persistente circulativa. Por otro lado se puede comparar esta situación con los estudios realizados en la misma época y desde las mismas condiciones climáticas con los resultados de los periodos de retención de la investigación de Marcenaro y Rayo, 2002 con el geminivirus de Condega, el cual obtuvo un promedio de 6 días, y el geminivirus de Santa Lucía (Salinas, 2002) con un promedio de 4.3 días.

Figura 5: Descenso de las partículas virales en la mosca blanca a medida que pasa el tiempo.



La fig. 5 refleja que el geminivirus de Sébaco cabe en la clasificación (semi- persistente) ya que pierde su capacidad de transmitirlo al séptimo día, después de adquirirlo.

6.5 Rango de hospedante de la mosca blanca

Después de analizar las plantas indicadoras de tabaco a través de las prueba de PCR, y la técnica de electroforesis se concluye que el geminivirus identificado en el cultivo del tomate del valle de Sébaco puede replicarse también en el cultivo del tabaco, ya que este se injertó de una planta de tomate infestada con tal geminivirus resultando positiva la prueba mencionada anteriormente, como se observa en la tabla 4.

Los virus transmitidos por la mosca blanca, infectan plantas de familias tales como: Compositae, Convolvulaceae, Crucíferas, Scrophulariaceae, Linaceae, Malváceae, Labiatae, Geraniaceae, Leguminosae, Tilaceae, Urticaceae, Verbenaceae, Fabiaceae, Rosaceae (Brown y Bird,1992; Costa, 1969; Salguero, 1992) Lo que demuestra el amplio nivel de hospedante.

Tabla 4: Muestras amplificadas por la técnica PCR y electroforesis

Cultivo	Transmisión	Edad	Síntomas	PCR
Tomate	Injerto	40 ddt	+	-
tabacun var. Sams	Injerto	150 ddt	+	-
tabacun var. Sams	Injerto	150 ddt	+	+
Tomate	Injerto	49 ddt	+	+
Tomate	Inoculación	49 ddt	+	+
Tomate	Injerto	45 ddt	+	+
Tomate	Injerto	48 ddt	+	+
Tomate	Injerto	48 ddt	+	+
Tomate	Injerto	37 ddt	+	+
Tomate	Adquisición	30 ddt	+	+
Tomate	Adquisición	30 ddt	+	-
Chiltoma	Injerto	45 ddt	-	-
Nicandra physiloides	Injerto	45 ddt	-	-

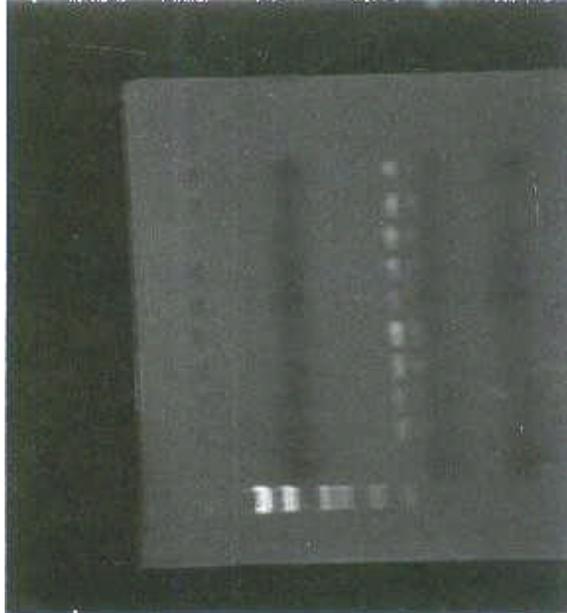


Fig 6: Análisis Electroforético del AND amplificado, correspondientes a la tabla 4, donde el primer carril corresponde al marcador Lambda/Hind III y los carriles restantes tabaco y muestras de tomates.

VII. CONCLUSIONES

1. El tiempo mínimo de alimentación que la mosca blanca necesita para adquirir el geminivirus de Sébaco relacionado al virus del enrollamiento de la hoja del tomate sinaloa es de 10 minutos.
2. El vector es capaz de adquirir el virus en un periodo desde 10 minutos hasta 48 horas.
3. El tiempo mínimo de adquisición que el vector necesita para transmitir el virus a una planta sana es de 10 minutos
4. El tiempo máximo de retención que la mosca blanca permanece infectiva después de un periodo de adquisitivo en una planta infestada con el geminivirus de sébaco es de 7 días.
5. La mosca blanca va disminuyendo su efectividad de transmisión a medida que pasa el tiempo.
6. La transmisión de geminivirus es más eficiente, a través de injertos que inoculadas a través de su vector.

VIII. RECOMENDACIONES

Realizar nuevos estudios para lograr la identificación y relación de los geminivirus causante de las enfermedades en las diferentes zonas productoras de tomate.

Tomando en consideración que el periodo de inoculación y adquisición es de 10 minutos, llevar a cabo estudios en años consecutivos, para determinar si este puede ser menor al valor mencionado a medida que pasa el tiempo.

Hacer estudios genómicos de *B. tabaci* que demuestren el verdadero genotipo presente en Nicaragua.

Realizar esta investigación en condiciones de campo, en diferentes regiones del país, y en diferentes hospederos de la mosca blanca.

Desarrollar estrategias de control de la mosca blanca a nivel de semillero, para obtener plantas libres de virus.

IX. BIBLIOGRAFIA

- BOCK, K. 1982. Geminivirus diseases. *Plant Diseases* 66 (3): 266-270.
- BONILLA, F. 1995 Periodo de adquisición, Latencia y Transmisión de geminivirus en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) por la mosca blanca (*Genn*) en Costa Rica. Tesis de lic. en Agronomía, Universidad de Costa Rica, Sede Regional del Atlántico Turrialba C.R.
- BROWN, JK; BIRD, J 1992. Whitefly- transmitted geminiviruses in the Americas y Caribbean Basin: Past and present. *Plant Disease* 76: 220-225.
- BROWN, JK. 1994. Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agroecosystems worldwide. *FAO Plant Protection Bulletin* 42 (1-2).
- BROWN, JK; FROHLICH, DR; ROSSELL, RC. 1995 a. the sweet potato or silver leaf white filies: Biotipes of *Bemisia tabaci* or an species complex *Annual Review of Entomology*.
- CABALLERO, R. y RUEDA, A. (1993) “Las moscas blancas en Honduras”, en: Las moscas blancas (*Homoptera-Aleyrodidae*), en America central y el Caribe. Turrialba. CATIE.
- COSTA, AS; BENNET, R, 1978. Transmission and phisical properties of the causal agent of mosaic yellow tomato. *American phytothological societ.* 68: 985-988.
- CABALLERO,1996, (metodología para el estudio de la mosca blanca y geminivirus), en identificación de la mosca blanca. p 1-10.
- DARDON, D. (1993). “Las moscas blancas en Guatemala”, en: las moscas blancas en America central y el Caribe. Turrialba. CATIE.

GOMEZ, D. 1992. Taller Centroamericano y del Caribe sobre Mosca Blanca. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

HILJE, L. et al., (1993) "Identification of the initiation sequence for viral-strand DNA synthesis of wheat dwarf virus". USA. EMBO journal No. 12, Pp. 4445-4452.

HILJE, L. 1996. Taller Centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca. CATIE. Turrialba. Costa Rica.

HOELZEL, A. R. 1998. Molecular Genetic Analysis of populations. A Practical Approach, 2a . ed., IRL Press, Department of Biological Sciences, University of Durham, USA. 445p

IDRIS, A. M., and J.K Brown. // 1998. // Sinaba Tomato Leaf Curl Geminivirus. Biological and Molecular Evidence for a new subgroup III virus. Department of plant sciences, university of Arizona, Tucson 85721.

INTA, 1999. Cultivo del tomate. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. p. 1-2. (Guía tecnológica No. 22)

LASTRA R. 1992. Las Moscas Blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe Memoria del II taller Centroamericano y del Caribe sobre moscas blancas 3-5 de Agosto de 1992. Los geminivirus un grupo de fitovirus con características especiales. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

MARCENARO, D.; RAYO, M.; 2002. Caracterización biológica y molecular de un geminivirus que afecta el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) en Nicaragua. Tesis (Ing. Agrónomo) Managua, Nic. Universidad Nacional agraria. Facultad de Agronomía. (Datos sin publicar).

MORALES, F. 1993. Los Geminivirus transmitidos por la mosca blanca en Memoria II taller Latinoamericano y del caribe sobre mosca blanca y geminivirus, Managua, Nicaragua. Pág. 9-13.

MORALES, F. Et al 1999. Cultivo del tomate. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. (Guía Tecnológica No. 22). P 1-2.

PERRING, T. COOPER, A. KASMER; D. SHIELDS, C. SHIELDS J. 1991. New Strain of sweet potato whitefly invades California Vegetables. California Agriculture 45(6).

ROSSET, D. 1986. Ecological and economic aspects of pest management and polycultures of tomatoes in Central America. Ph. D. Thesis. University of Michigan, Ann Arbor.

ROSSET, D. 1986. El manejo de insectos en tomate, algunas anotaciones sobre la experiencia en Centroamérica. Manejo Integrado de Plagas (C.R.) 7: 1-2.

RAMÍREZ, P.; RIVERA; BUSTAMANTE, R.; 1996; Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus; Identificación de geminivirus. Pág. 20.

ROJAS, M. 2000, El Mosaico Dorado y otras enfermedades del fríjol común causados por geminivirus transmitidos por la mosca blanca en la América latina. Los begomovirus. University of California Davis, USA. P 87.

ROJAS, A.; KVARNHEDEN, A.; and VALKONEN, J. 2000. Geminiviruses infecting tomato crop in Nicaraguan. Plant Disease (USA) 84:843-846.

SALGUERO, V. 1990; La mosca blanca (*bemisia tabaci*) Gennadius. Nota Técnico Científica No. 4 Disciplina de Protección Vegetal.

SERRANO, L. (1993). "Las moscas blancas en el Salvador", en: Las moscas blancas en America Central y el Caribe. Turrialba. CATIE.

UZCATEGUI, R.; LASTRA, R. 1978. Transmission and physical properties of the causal agent of mosaic yellow tomato American physiological society. 68: 985-988.

X. ANEXOS

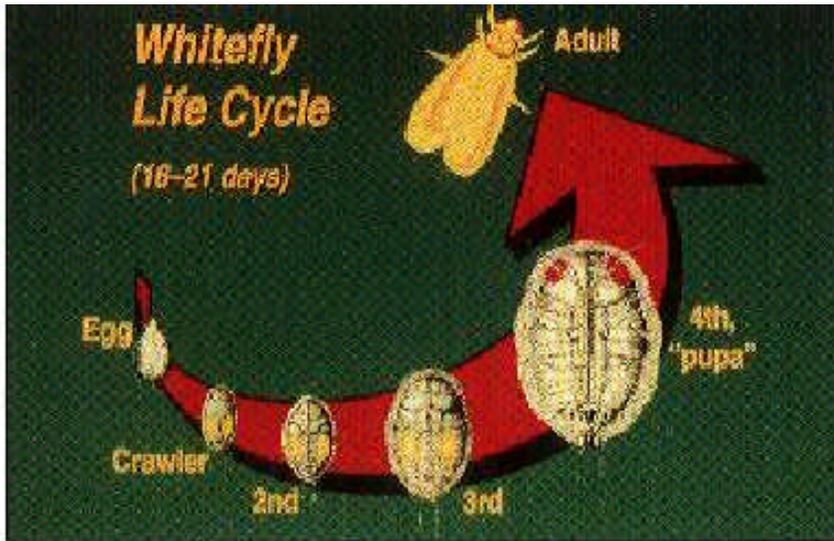


Fig. 1. Ciclo de vida de *B. tabaci* Genn



Fig. 2. tomates procedentes de plantas atacadas con el geminivirus de Sébaco

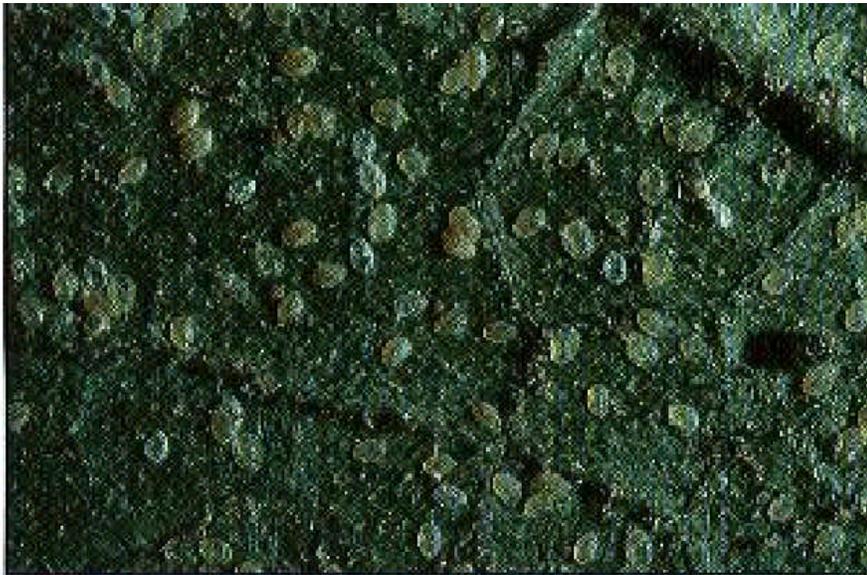


Fig. 3. poblaciones de *B. Tabaci* en su estado ninfal en una hoja de tomate.