



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

TRABAJO DE TESIS

Caracterización biológica y molecular de geminivirus que afectan el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Nicaragua.

AUTORES

Br. Delfia Isabel Marcenaro Rodríguez

Br. Mayling Selenia Rayo

ASESOR

Ing. MSc. Aldo Rojas Solís

MANAGUA, NICARAGUA-2002

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINAS
DEDICATORIA	i-ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE ANEXOS.....	vii
RESUMEN.....	ix
I INTRODUCCION.....	1
II OBJETIVOS.....	7
III MATERIALES Y METODOS.....	8
3.1 Localización del experimento.....	8
3.2 Material experimental.....	8
3.3 Metodología	10
3.3.1 Fase de invernadero	10
3.3.2 Fase fuera de invernadero	12
3.3.3 Caracterización biológica	13
3.3.3.1 Porcentaje de transmisibilidad	13
3.3.3.2 Período de adquisición.....	13
3.3.3.3 Período de inoculación.....	13
3.3.3.4 Período de retención.....	14

3.3.3.5 Rango de hospedante.....	14
3.4 Caracterización molecular.....	14
3.4.1 Fase de laboratorio de biología molecular UNA.....	15
3.4.2 Fase de laboratorio de biología molecular Suecia.....	18
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 Porcentaje de transmisibilidad.....	31
4.2 Período de adquisición.....	31
4.3 Período de inoculación.....	34
4.4 Período de retención.....	37
4.5 Rango de hospedantes.....	39
4.6 Fase de invernadero.....	39
4.7 Fase fuera de invernadero.....	42
4.7.1 Severidad del geminivirus en los materiales evaluados.....	42
4.7.2 Incidencia del complejo mosca blanca-geminivirus en los materiales.....	43
4.7.3 Promedio de mosca blanca en los materiales evaluados.....	44
4.8 Caracterización molecular.....	45
V CONCLUSIONES.....	47
VI RECOMENDACIONES.....	49
VII BIBLIOGRAFIA.....	50
VIII ANEXOS.....	55

DEDICATORIA

Dedico mi tesis a mis adorados padres:

Tomasa Rodríguez y

Joaquín Marcenaro Balladares .

A los que amo infinitamente y que doy gracias a Dios por tenerlos a ellos con vida que sé que con mucho esfuerzos, han podido realizar mi meta de terminar mi carrera .

Padres nunca olvidaré todos los momentos que han estado a mi lado y como siempre estuvieron ahí dándome cariño, apoyo, comprensión y fuerzas para que saliera adelante y este día maravilloso se los debo a ustedes, con todo mi amor .

Dios los proteja y los bendiga y que me les dé vida por muchos años más..

A mis hermanos:

Erika Marcenaro

Ilsa Marcenaro y

Joaquin Marcenaro

Por brindarme su apoyo, comprensión y ayuda incondicional, no olvidaré todos los consejos y ánimos que me dieron para que siguiera adelante.

Los amo!

Delfia.

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo de tesis al ser que me dio la vida, mi madre: Sra. Esmilda del Socorro Rayo Zeledón, como un reconocimiento a su apoyo incondicional.

*Ya que este título es el fruto de su esfuerzo, trabajo y sacrificios;
y que a través de su dedicación y consejos a lo largo de toda mi vida supo hacer de mi una persona de bien.*

A mis hermanos:

Amy Selenia Rayo

Nora Raquel Díaz Rayo

Javier Iván Díaz Rayo y

Neimar R. Díaz Rayo.

Con los que comparto la alegría de haber alcanzado esta meta, con mucho cariño a mis tías y a mi abuelita Zenelia Zeledón Zeledón quienes nunca me negaron una voz de aliento para seguir adelante hasta hoy.

Los quiero mucho!

Mayling S. Rayo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos infinitamente a Dios por darnos vida, sabiduría y fuerzas necesarias para llegar a culminar uno de los sueños más anhelados de nuestras vidas.

Gracias señor por guiarnos e iluminarnos por el buen camino durante esta etapa de nuestros estudios y sobre todo por llegar a este día tan especial e inmemorable.

A la cooperación Sueca-UNA por ayudarnos a financiar nuestra tesis, a los señores Jari Valkonen, Anders Kvarneheden, por brindarnos apoyo y conocimientos necesarios en la elaboración de nuestro trabajo.

A nuestro asesor el Ing. Aldo Rojas por darnos la oportunidad de realizar nuestro trabajo de tesis, gracias por su apoyo incondicional, tiempo, dedicación y conocimientos que nos brindó durante la realización de este trabajo y que gracias a usted hemos llegado a este día.

Al Ing. Arnulfo Monzón por el aporte de sus conocimientos en el análisis de nuestros resultados.

Al Sr. Jorge Hernández por ayudarnos durante todo el tiempo que estuvimos realizando nuestra tesis.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron con nuestro trabajo investigativo.

INDICE DE TABLAS

TABLA No.	PAGINAS
1. Escala de evaluación para geminivirus en tomate (REDCAHOR (1999)., modificada por Rojas, (2000).....	11
2. Plantas de la familia solanaceae injertadas con el geminivirus de Condega.....	14
3. Extracciones de ADN del aislado de Condega.....	16
4. Programa de 35 ciclos usados en la reacción PCR.....	17
5. Extracciones de ADN de los aislados de Santa Lucía, Condega y Sébaco.....	19
6. Programa PCR-1 para producto PCR.....	20
7. Programa PCR-2 para plásmido de ADN purificado.....	21
8. Muestras de PCR purificadas (ADN purificado).....	23
9. Colonias seleccionadas para la clonación.....	25
10. Plásmidos purificados.....	26
11. Programa PCR para secuenciación de ADN.....	29

12. Alimentación del vector en diferentes tiempos, sobre una planta enferma para que adquiriera el virus para transmitirlo a plantas sanas (Período de adquisición).....	33
13. Período de inoculación del geminivirus en plantas de tomate expuestas a <i>B. tabaci</i>	36
14. Período de retención del geminivirus en plantas de tomate expuestas a <i>B. tabaci</i>	38
15. Resultados de la prueba PCR realizadas en laboratorio de biología molecular de la UNA en especies de la familia solanáceas injertadas con el geminivirus de Condega.....	39
16. Concentración de ADN de los plásmidos purificados.....	46
17. Porcentaje de similitud de la secuencia de los geminivirus de Condega, Santa Lucía y Sébaco.....	46

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No.	PAGINAS
1.- Porcentaje de plantas enfermas en los diferentes periodos de adquisición.....	32
2.- Porcentaje de plantas enfermas en los diferentes periodos de inoculación.....	34
3.- Porcentaje de plantas enfermas en los diferentes días de retención.....	37
4.- Porcentaje de severidad de los materiales inoculados a los 7 ddt.....	40
5.- Porcentaje de severidad de los materiales inoculados a los 14 ddt.....	41
6.- Porcentaje de severidad de los materiales inoculados a los 21 ddt.....	41
7.- Porcentaje de severidad de geminivirus en los materiales evaluados.....	42
8.- Porcentaje de incidencia de geminivirus en los materiales evaluados.....	43
9.- Dinámica poblacional de mosca blanca en los materiales evaluados.....	44

INDICE DE ANEXOS

ANEXO No.	PAGINAS
1.- Materiales de tomate evaluados en fase de invernadero.....	56
2.- Material de tomate infectado por geminivirus.....	57
3.- Materiales evaluados en fase fuera de invernadero.....	58
4.- Frutos de tomate silvestres evaluados en la fase fuera de invernadero.....	59
5.- Fuente de inóculo del geminivirus de Condega.....	60
6.- Visualización de bandas de nucleótidos mediante técnica de electroforesis.....	61
7.- Organización típica del genoma de un begomovirus.....	62
8.- Composición química del fertilizante líquido completo NPK.....	63
9.- Análisis de varianza para el tratamiento 1 bajo condiciones de invernadero.....	64
10.- Análisis de varianza para el tratamiento 2 bajo condiciones de invernadero.....	65
11.- Análisis de varianza para el tratamiento 3 bajo condiciones de invernadero.....	66

12.-	Análisis de varianza de la severidad del geminivirus en los materiales evaluados en la fase fuera de invernadero.....	67
13.-	Análisis de varianza para determinar la incidencia del complejo mosca blanca-geminivirus en los materiales evaluados bajo condiciones fuera de invernadero.....	68
14.-	Análisis de varianza realizado en la población de mosca blanca en la fase fuera de invernadero.....	69

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo consistió en la caracterización biológica y molecular de geminivirus que afectan el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), el estudio se realizó en la Universidad Nacional Agraria (UNA), en el período de enero 2001 a enero 2002. Se efectuó en tres fases: la primera fase de invernadero, donde se utilizaron plantas de tomate de la variedad UC-82, crías de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn), fuente original del aislado del geminivirus de Condega, con el objetivo de caracterizar biológicamente el geminivirus, a través de períodos de adquisición, inoculación y retención, previamente para la realización de estos períodos, se determinó el porcentaje de transmisibilidad de la colonia de mosca blanca, el cual fue de 45% lo que indicó que para asegurar la transmisibilidad del virus fue necesario usar 5 moscas por planta. Los períodos de adquisición e inoculación fueron los tiempos de 2, 5, 10 y 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 18, 24 y 48 horas con 3 repeticiones de cada período, los datos obtenidos de estos períodos fueron analizados mediante un análisis de regresión logístico binario, resultando que el vector fue capaz de adquirir y transmitir el virus tanto en 10 minutos (40% y 33%) como en 48 horas (60% y 66.66%) respectivamente, respecto al período de retención se estableció realizándose un promedio de los porcentajes de severidad de las 3 repeticiones mostrando como resultado que el vector conservó su capacidad de transmisión del virus hasta el sexto día con 45.07% de transmisibilidad, también se evaluaron 5 especies de la familia solanáceas injertándolas con plantas afectadas con el geminivirus de Condega, para conocer cuales son hospederas del virus, resultando la especie *Nicotiana tabacum* cv. *Benthamiana* con síntomas del virus. En esta misma fase se evaluaron 4 materiales de tomate (55, 111, 148, 112) usando como testigo la variedad UC-82, se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) y se evaluó la variable severidad de la enfermedad a los datos obtenidos a través de ANDEVA y separación de medias según Duncan, estos materiales se evaluaron mediante cuatro tratamientos (inoculaciones), el primero a los 7 ddt, el segundo a los 14 ddt, el tercero a los 21 ddt y el último tratamiento fueron las plantas sin inocular (testigos), el análisis indicó que la variedad UC-82 fue la mas susceptible ante el complejo mosca blanca-geminivirus presentando mayores porcentajes de severidad y el material 112 resultó el mas resistente, con menos porcentajes de severidad. La segunda fase se realizó fuera del invernadero, evaluándose ante el complejo mosca blanca-geminivirus 3 materiales, incluyendo la variedad UC-82 como testigo. Se utilizó un Diseño completamente al Azar, tomando en cuenta las variables severidad, incidencia y población de mosca blanca,

a los datos obtenidos se les realizó ANDEVA y separación de medias según Duncan, el que mostró que el material 55 fue el mejor, ya que presentó menos porcentaje de severidad (40%), el peor material fue la var. UC-82 ya que mostró 58.75% de severidad, con relación a la incidencia todos los materiales evaluados resultaron al final de los muestreos con igual porcentaje de incidencia (100%) y en el caso de la población de mosca blanca la variedad UC-82 fue la que presentó mas adultos por planta en comparación con el resto de materiales. La tercera fase fue realizada en el laboratorio de biología molecular en la UNA y Suecia con el propósito de caracterizar molecularmente los geminivirus de Condega, Santa Lucía y Sébaco, secuenciando un fragmento de 1200 pares de bases del componente A para comparar a través de las secuencias de nucleótidos los porcentajes de similitud que existen entre ellos, dando como resultado que el geminivirus de Sébaco con el de Santa Lucía alcanzó mayor porcentaje de similitud con un 95.2 con respecto al geminivirus de Condega que obtuvo un 89.0%.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es originario de América del Sur (Perú, Ecuador) y México países en donde se encuentra de forma silvestre, es uno de los cultivos más importante a nivel mundial, pues se utiliza como materia prima para la industria, además por su variado uso para el consumo fresco, por el alto valor nutritivo que posee y el gran contenido de vitaminas A y C. En nuestro país este cultivo constituye una de las hortalizas más importantes, contando con la mayor porción del área cultivada seguido por el repollo y la cebolla (Van Haeff, 1983 citado por Olivas, 1996).

El cultivo del tomate se comienza a cultivar en Nicaragua, en los años 40's, iniciándose en el municipio de Tisma en Masaya, posteriormente se comienza a difundir en el resto del país, a partir de los años 70's los rendimientos de este cultivo oscilaron entre los 31,936 kg/ha y 39,920 kg/ha, en la actualidad 11,976 kg/ha son considerados buenos rendimientos (Rojas, 2000).

En los años 80's se introdujo al país la variedad UC-82 proveniente de California, Estados Unidos. Esta es una variedad semi-industrial, con rendimientos de hasta 23,000 kg/ha. Hasta la fecha esta variedad es la más utilizada por los productores, sin embargo, se están usando otras variedades como son: Río Grande, VF-134, Caribe, Tropic, Floradades, Manalucie, MTT-13, Charm, Gem Pride, Gemstar, Topsin, Yaqui, Bute, Sunny, Marglobe, M-82, Brigade y algunos híbridos como Peto-96, Peto-98 (INTA, 1999).

El cultivo del tomate es susceptible al ataque de plagas como Coralillo (*Elasmopalpus lignosellus* Zeller), gusanos del fruto (*Helicoverpa zea*, *Spodoptera sunia* y *Spodoptera exigua*) y enfermedades tanto fungosas, bacterianas como virales, siendo la más importante las virosis causadas por geminivirus, que provoca una serie de alteraciones en el organismo de la planta de tomate resultando como consecuencia de esto, plantas pequeñas con las hojas arrugadas (crespo); frutos pequeños y en algunos casos no llegan a producir frutos, causando bajos rendimientos, producto de mala calidad y pérdidas económicas considerables para el productor (INTA, 1999).

Desde mediados de los años 80's diferentes cultivos de importancia alimenticia, incluyendo frijoles (*Phaseolus vulgaris* L.) y tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) han sido severamente afectados por geminivirus transmitidos por mosca blanca en América Central y el Caribe (Brown y Bird, 1992). Las pérdidas en muchos cultivos han sido significativas, sin embargo, la respuesta más común ha sido la aplicación masiva de insecticidas lo que ha incrementado los costos, pero los resultados no han sido significativos (Hilje y Arboleda, 1993). Esta situación es compleja, ya que se han encontrado un buen número de geminivirus indígenas que están infectando tomates en América, entre éstos tenemos: Virus del Enrollamiento de las hojas del tomate Sinaloa (STLCV) en México y Costa Rica, Virus del Moteado del tomate (ToMoV) en Florida, Virus de Cuchara del Tomate (TLCrV) en México, Virus del Tomate Habana (HTV) en Cuba, Virus del Moteado Taíno (TTMoV) en Cuba, Virus del Enrollamiento de las Hojas y Enanismo (TDLCV) en Jamaica, Virus del Mosaico Amarillo de las Hojas (PYMV) en Trinidad y Tobago, Argentina, Virus del Enrollamiento Amarillo de las Hojas (TYLCV) en República Dominicana, Virus del Moteado Suave del Tomate (TMMoV) en Honduras (Rojas *et al.*, 2000).

La mosca blanca puede afectar al tomate tanto por el daño directo el cual es causado por la ninfa y adultos de mosca blanca y ocurre cuando succionan los nutrientes del follaje. El daño indirecto y más importante de mosca blanca es causado por la transmisión de geminivirus, esta transmisión es del tipo persistente circulativo, propio de los homópteros (Duffus *et al.*, 1986). El problema actual con mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn) obedece básicamente a 2 factores: sus poblaciones desmesuradas y la asociación con geminivirus que, por reproducirse en el floema de las plantas son muy dañinos (Lastra, 1993, citado por Hilje, 1994) .

B. tabaci posee características específicas como: en todas las etapas de desarrollo, permanece "protegida" en el envés de las hojas (López-Avila, 1986, Citado por Rojas, 1993), desarrolla resistencia a los insecticidas con mucha facilidad, principalmente a los fosforados y piretroides (Dittrich *et al.*, 1990).

Salas (1993), trabajando con folíolos de tomate a nivel de laboratorio a una temperatura de 25 °C en Venezuela, determinó el ciclo de vida para *B. tabaci*. Encontrando que la duración en días de la diferentes fases de desarrollo fue la siguiente:

Ciclo de vida de *Bemisia tabaci* (Salas,1993)

Estadios	Tomate
Huevo	7.28
Ninfa I	4.04
Ninfa II	2.66
Ninfa III	2.45
Ninfa IV	5.83
Adulto	22.26

De igual forma Alvarenga y Anderson (1992), citado por Rojas, (1993), en condiciones de laboratorio a una temperatura promedio de 26 °C, en Nicaragua, determinaron el ciclo de vida para *Bemisia tabaci* encontrando que el tiempo de desarrollo duró 19.2 días con una variación de 1.3 días menos ó más. En general se puede observar que el ciclo de vida de la mosca blanca oscila alrededor de los 20 días.

B. tabaci tiene una gran capacidad para adaptarse a condiciones adversas, también a diferentes condiciones de temperatura, por lo que una vez establecida en una zona, el movimiento local de corta distancia entre los cultivos y los hospederos silvestres está en función de la disponibilidad de alimentos y humedad, es el mecanismo principal de la sobrevivencia que influye sobre la dinámica poblacional dentro de la zona. Estos movimientos permiten la transmisión de virus de un rastrojo u hospedero silvestre a un nuevo cultivo (Guharay, 1994).

B. tabaci es de hábito polífago (Gerling, 1990), dada la diversidad de cultivos sembrados en Nicaragua, por lo que sus poblaciones siempre se mantienen activas. En Mesoamérica y áreas vecinas existen reportadas alrededor de 70 hospedantes de mosca blanca entre

plantas silvestres, ornamentales y cultivadas agrupadas en 39 familias mundialmente, se asocia con al menos 500 especies, en 74 familias como: solanáceas, cucurbitáceas, amarantáceas, malváceas, leguminosas, (Hilje, 1994).

Los Geminivirus (familia Geminiviridae) han emergido como importantes patógenos de plantas alrededor del mundo (Brown, 1997). Ellos se caracterizan por presentar partículas isométricas y circulares, y un genoma de ADN de cadena simple (Lazarowitz, 1992) estos pueden ser subdivididos en tres géneros sobre la base de su rango de hospedante, insecto vector y su organización genómica (Padidam *et al.*, 1997).

El género Begomovirus (Subgrupo III) nombre derivado del virus tipo, **Bean golden mosaic virus (BGMV)**, está formado por virus distribuidos en el Viejo y Nuevo Mundo, de uno o dos componentes genómicos, tienen un genoma monopartita o bipartita, son transmitidas por mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn), incluyendo el biotipo B conocido como *Bemisia argentifolii* e infectan plantas dicotiledóneas. El genoma bipartita de los begomovirus está compuesto de dos componentes de ADN, denominados ADN-A y ADN-B, los cuáles codifican para funciones virales esenciales y necesarias para establecer infección sistémica. Los genes son nombrados de acuerdo al componente y la cadena de ADN en que se encuentren (sentido viral V o complementario C). El componente ADN-A posee cuatro genes: Tres en la cadena complementaria: AC1, AC2 y AC3 y uno en el sentido viral: AV1. Los genes AC poseen secuencias traslapadas en ciertas regiones, lo cual es una estrategia que le permite al virus ser más eficiente por el pequeño tamaño de su genoma. El componente ADN-A codifica todas las funciones virales necesarias en la replicación y encapsidamiento del genoma. La proteína Rep codificada AC1, se encuentra directamente involucrada en la replicación. La proteína AC2 es un activador transcripcional del gen de la proteína de capsido. La proteína AC3 contribuye al proceso replicativo de manera indirecta. La proteína de la capsido es codificada por el gen AV1. La proteína de la capsido determina la especificidad de los insectos y es necesaria para la transmisión de virus por insecto. El componente ADN-B codifica para dos genes, uno en la cadena complementaria, BC1 y otro gen en el sentido viral BV1, codifica las funciones necesarias para el desplazamiento del virus dentro de la

planta, el desarrollo de síntomas y el rango de hospederos. La proteína de movimiento BV1 se localiza en el núcleo y la proteína BC1 puede potenciar el movimiento de ácidos nucleicos de célula a célula a través de plasmodesmos. No existe similitud entre las secuencias de los nucleótidos de los dos componentes de ADN de un mismo begomovirus, excepto por la región de 200 pares de bases llamada **región común**, esta región no codifica proteínas y contiene secuencias que se encuentran en la replicación del ADN viral y en la expresión de los genes (Rojas, M del R., 2000).

La virosis transmitida por geminivirus se da por la relación virus-vector a través de tres procesos, que son: período de inoculación, adquisición y retención.

- El período de adquisición: Tiempo mínimo necesario de alimentación, sobre una planta enferma, para que el insecto adquiriera el virus en cantidad suficiente para transmitirlo.
- Período de inoculación: Tiempo mínimo necesario de alimentación, sobre una planta sana para que esta resulte contaminada.
- Período de retención: Tiempo durante el cual el insecto conserva su capacidad de transmisión (sin una nueva adquisición) (Belder, 1986).

En el caso particular de Nicaragua en los años 70's en Tisma, Masaya, se observó una enfermedad en el cultivo del tomate que se creyó era transmitida por *B. tabaci*, pero con una muy baja incidencia. A inicios de los 80's esta enfermedad también apareció en el valle de Sébaco y fue asociada con un rápido incremento de las poblaciones de mosca blanca. En 1988 la epidemia afectó el 100% del cultivo del tomate del Valle de Sébaco y otras regiones del país, con reducciones drásticas del rendimiento. A final de 1990 el problema se hizo a nivel nacional y la producción de tomate virtualmente desapareció, desde entonces el problema ha persistido (Rojas *et al.*, 2000).

Cuatro grupos de geminivirus del tomate transmitidos por mosca blanca se han reportado en Nicaragua infectando el cultivo del tomate: Un primer grupo relacionado con el Virus del Enrollamiento de las hojas del Tomate Sinaloa (STLCV) en Matagalpa, Estelí y Chontales, Un segundo grupo relacionado con el Virus de Mosaico Dorado de la Sida (SiGMV) en Boaco, un tercer grupo relacionado con el Virus de la Hoja de Cuchara del

Tomate (TLCrV) en Chontales, y un cuarto grupo relacionado con el Virus del Moteado Suave del Tomate (TMMoV) en Sébaco, Condega y Masaya (Rojas *et al.*, 2000).

Para el combate del complejo mosca blanca-geminivirus, se han implementado diferentes opciones de Manejo Integrado de Plagas (insecticidas químicos y botánicos, barreras vivas y muertas, cultivos trampas, recuentos, uso de trampas amarillas impregnadas con aceite de motor, semillero cubierto con manta, etc). Sin embargo, el problema persiste por lo que es necesario seguir buscando otras alternativas entre estas están el conocimiento epidemiológico de la enfermedad así como el uso de variedades tolerantes o resistentes ya sea para su uso directo por los productores o como fuente de genes para trabajos de mejoramiento genético ya sea por mejoramiento convencional o con técnicas avanzadas, como el uso de técnicas de Biología Molecular lo que permite realizar caracterización y aislamiento de genes de resistencia.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

1. Caracterizar biológica y molecularmente los geminivirus transmitidos por mosca blanca que afectan el cultivo del tomate en Nicaragua.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar el porcentaje de transmisibilidad que tienen las moscas blancas para transmitir virus después de un período de alimentación.
2. Determinar el tiempo mínimo de alimentación de una mosca infectiva en su capacidad de transmitir el virus a plantas sanas, así como el tiempo mínimo de alimentación del vector sobre una planta enferma, para que adquiriera el geminivirus en cantidad suficiente para transmitirlo en plantas sanas.
3. Determinar el tiempo máximo en que una mosca blanca mantiene su capacidad de transmisión del geminivirus a plantas sanas.
4. Determinar la transmisión del geminivirus de Condega en especies injertadas de la familia solanaceae.
5. Evaluar la incidencia y severidad del complejo geminivirus-mosca blanca en diferentes materiales de tomate en condiciones de invernadero y fuera de invernadero.
6. Determinar la secuencia de un fragmento de ADN genómico de los geminivirus de Condega, Santa Lucía y Sébaco.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1-Localización del experimento

El trabajo se llevó a cabo en la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km. 12 ½ carretera norte, en el Departamento de Protección Agrícola y Forestal (DPAF) a una latitud de 12°08'36'' Norte, longitud 86°09'49'', con una altitud de 56 m.s.n.m una precipitación 1140 mm anual, con temperatura promedio de 30° C siendo la Humedad Relativa de 71% en Managua (INETER, 2001).

Este trabajo constó de 3 fases experimentales: de invernadero, fuera de invernadero y de laboratorio.

3.2-Material Experimental

a. Semilleros:

Para la preparación de los semilleros se utilizaron semillas de tomates de la variedad UC-82, empleando tierra esterilizada con calor 200 °C por 6 horas. Cuando las plantas tuvieron aproximadamente 15 días de haber emergido se transplantó una plántula por macetera pequeña y se aplicó fertilizante líquido completo (N-P-K), a una dosis de 50 ml/planta, haciendo una dilución de 2.5 cc de N-P-K por litro de agua.

b. Cria de Moscas Blancas (*B. tabaci*):

Se hicieron recolectas de adultos de moscas blancas en plantaciones de frijol (*Phaseolus vulgaris* L), ayote (*Cucurbita spp*), pipián (*Cucurbita pepo* L) y tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) de San Francisco Libre; estas moscas se trasladaron al criadero y fueron puestas a alimentarse en plantas jóvenes de frijol libres de virus, estableciéndose el pie de cría, hasta obtener la primera progenie.

La cría fue establecida en jaulas de madera con malla de nylon de 150 cm de largo por 80 cm de ancho y 100 cm de altura.

Una vez obtenida la primera progenie se obtienen colonias de moscas blancas libres de virus, utilizándose posteriormente en los diferentes periodos de inoculación, adquisición y retención. Para esta obtención fue necesario reemplazar constantemente plantas viejas por plantas jóvenes de frijol y así mantener poblaciones considerables de moscas.

c. Manejo del vector (succionadores y trampas “clip”).

Se utilizaron jaulas de fijación en hojas (trampas “clip”) para inoculación de plantas y así permitir que la mosca se alimente, utilizando succionadores para sacar las moscas y colocarla en la plantas a usar en los diferentes períodos de inoculación, adquisición y retención.

d. Fuente de inóculo (aislados).

Como fuente de inóculo se usaron plantas de tomate variedad UC-82 enfermas con los geminivirus de diferentes regiones de nuestro país recolectadas por Rojas *et al.*, (2000). Los aislados de Condega, Santa Lucía y Sébaco respectivamente, fueron mantenidos en el invernadero de virología, en el Departamento de Protección Agrícola y Forestal (DPAF) de la Universidad Nacional Agraria (U.N.A). Se recolectó tejido enfermo de cada aislado, tomando únicamente los brotes tierno. Los aislados fueron identificados en Suecia en el Departamento de Biología de Plantas de la Universidad de Ciencias de la Agricultura (SLU), en Uppsala, Suecia por Rojas *et al.*, (2000), a través de técnicas de Biología Molecular.

Estas plantas fueron utilizadas para injertos para mantener fuentes de inóculos recientes, y se fertilizaron con fertilizante líquido completo (N-P-K) a razón de 50 ml/planta y se podaron periódicamente.

3.3- Metodología

3.3.1-Fase de Invernadero

Esta fase se realizó en la Universidad Nacional Agraria, en el invernadero de virología a una temperatura promedio de 35.2 °C en el Departamento de Protección Agrícola y Forestal (DPAF).

Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA) bifactorial para los tratamientos que son inoculaciones a los 7 ddt (días después del trasplante) constituyendo el primer tratamiento, a los 14 ddt el segundo, a los 21 ddt y el cuarto tratamiento que fue el testigo, donde el factor A fueron las fechas de muestreos y el factor B los materiales. Igualmente se utilizó el mismo diseño para los materiales siendo el factor A las fechas de muestreos y el factor B los tratamientos (inoculaciones), en los cuales se efectuó un análisis de varianza y separación de medias según Duncan. Para el análisis de varianza se realizó la transformación arcseno ($\theta = \arcseno \sqrt{p}$) en la variable severidad.

Durante esta fase se establecieron semilleros de UC-82 semanalmente, con el objetivo de tener plantas aptas para ser inoculadas en diferentes etapas fenológicas al igual que se sembró frijol DOR-364 en maceteras, para luego introducirlas al criadero de mosca blanca y así tener a disposición moscas para los experimentos.

Durante esta fase se evaluaron 4 materiales de tomate silvestre que provienen de la Red Colaborativa de Investigación y Desarrollo de Hortalizas para América Central, República Dominicana y Panamá (REDCAHOR). Los materiales que se analizaron tiene su propia codificación siendo las siguientes: 55, 111, 148, 112 y como testigo local la variedad UC-82.

Se utilizaron 20 maceteras con 5 plantas de cada material incluyendo la UC-82 como testigo, para un total de 100 maceteras. Las plantas fueron inoculadas en diferentes etapas fenológicas, los materiales fueron puestos en semilleros a una distancia entre hileras de

10 cm y entre plántulas 2 cm, se trasplantaron a las maceteras, utilizando una planta por macetera, a los 19 días después de la siembra.

Para la inoculación viral de cada tratamiento se utilizaron moscas sanas del criadero; colocando 30 moscas por trampa donde se pusieron a alimentar en el aislado de Condega, por un periodo de 48 horas, luego se retiró la trampa con las moscas ya infectadas y se colocaron 5 moscas por trampa en cada planta (5 plantas por material incluyendo la UC-82) para un total de 20 plantas, posteriormente se dejaron alimentando las moscas por un tiempo de 24 horas, luego las trampas con moscas fueron retiradas de cada planta y se eliminaron las moscas que estaban adheridas a la hoja de la planta.

Luego estas plantas inoculadas se trasladaron al invernadero, para evaluar el porcentaje de severidad de la virosis en los diferentes materiales.

El registro de severidad se realizó por tratamiento dos veces a la semana por 6 semanas. Se tomaron 25 plantas por tratamiento (4 tratamientos) para un total de 100 plantas. Se utilizó la siguiente escala de severidad de REDCAHOR (1999) y modificada por Rojas (2000).

Tabla 1: Escala de evaluación para geminivirus en tomate

GRADO	SEVERIDAD (SINTOMAS)
0	No hay síntomas visibles
1	Débil mosaico y corrugado de la lámina foliar en las hojas nuevas
2	Mosaico y corrugado de las hojas generalizado
3	Mosaico, corrugado y deformación de hojas y ramas
4	Enanismo y deformación severa

3.3.2-Fase fuera de invernadero

El diseño que se utilizó fue un Diseño completo al azar (DCA), bifactorial , realizándose un análisis de varianza y separación de medias según Duncan para la variable de severidad e incidencia y con datos transformados para la variable mosca blanca $(X+0.5)^{1/2}$.

Esta fase consistió en sembrar dos de los materiales a evaluar (148 y 55) más la variedad testigo UC-82, se realizaron registros para evaluar la incidencia y severidad del complejo mosca blanca-geminivirus.

El área de terreno que se ocupó para la siembra fue de 100 m² de parcela útil con una distancia entre planta de 40 cm y con una distancia entre surco de 100 cm (1 m) a una profundidad de 15 cm. Estos materiales fueron transplantados a maceteras a los 21 días después de la siembra y se sembraron al campo a los 16 días después del transplante (ddt), en total se sembraron 75 plantas, 25 plantas por material, incluyendo la testigo UC-82. El fertilizante que se usó fue completo granulado más Urea 46%, la preparación fue de 1 lb de urea 46% más 3 lbs de completo, a razón de 16.28 g, se fertilizó dos veces, la primera a los 8 ddt en el campo y la segunda a los 21 ddt en el campo.

La fuente de inoculación fue natural y semanalmente se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad en cada uno de los materiales a través del registro de plantas enfermas. Se usó la misma escala de severidad para evaluación de geminivirus de REDCAHOR, usada en la fase de invernadero.

Los muestreos fueron de estaciones fijas en cada estación se muestrearon 5 plantas por repetición (4 repeticiones) para un total de 20 plantas por tratamiento para determinar la severidad usando la escala de REDCAHOR. Los muestreos se realizaron dos veces a la semana, finalizando cuando las plantas estaban en período de fructificación y floración para un total de 10 muestreos. Se hicieron muestreos de dinámica poblacional de mosca blanca que consistían en contar el número de moscas en la tercera hoja de cada planta en donde se registraban el número de adultos por planta.

3.3.3-Caracterización biológica

3.3.3.1- Porcentaje de transmisibilidad del geminivirus de condega.

Para la inoculación de estas plantas las moscas se pusieron a alimentar en el aislado del geminivirus de Condega por un tiempo de 48 horas, posteriormente se colocó 1 mosca por planta por trampa y se dejaron por un tiempo de 24 horas, este proceso se realizó 2 veces, utilizándose 20 plantas de tomate variedad UC-82 por cada repetición, luego que las plantas fueron inoculadas se trasladaron al invernadero para observar las síntomas características del virus. Las plantas fueron inoculadas a los 15 ddt.

Descripción de los períodos que se evaluaron:

En los períodos de adquisición e inoculación se realizó un análisis de regresión logístico binario y en el período de retención un promedio de las tres repeticiones, con el objetivo de conocer los porcentajes de infectividad del virus, en los días que el vector retuvo el geminivirus.

3.3.3.2-Período de adquisición: Se tomaron 25 moscas libres de virus y se pusieron a alimentar del aislado de Condega, primeramente por un periodo de 2 minutos luego se pasaron a 5 plantas sanas de tomates por 48 horas utilizando 5 moscas por trampa y 1 trampa por planta, luego el mismo proceso se repitió para los períodos de alimentación posteriores que fueron: 2, 5, 10 y 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 18, 24 y 48 horas. Utilizando en este proceso un total de 65 plantas y 325 moscas blancas por repetición.

3.3.3.3-Período de Inoculación: Se pusieron a alimentar 25 moscas blancas durante un tiempo de 48 horas en los aislados (plantas infectadas) posteriormente se pasaron a 5 plantas sanas de tomates por un período de 2 minutos, usando 1 trampa por planta y 5 moscas por trampa. El proceso se repitió para los períodos de 2, 5, 10 y 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 18, 24 y 48 horas.

3.3.3.4-Período de retención: Se tomaron 20 moscas blancas, se pusieron a alimentar en el aislado por 48 horas, luego se pasaron a 20 plantas sanas colocando 1 mosca por planta en su respectiva trampa de manera que se dejaron alimentando por 24 horas. Posteriormente se tomaron estas mismas moscas y se pasaron a otras plantas sanas, siempre manteniendo 1 mosca por planta y por un mismo período de alimentación igual a 24 horas, se repitió el proceso hasta que las moscas se murieron.

3.3.3.5-Rango de hospedantes

Las plantas fueron injertadas con patrón de una planta infectada de geminivirus de Condega, para observar y determinar los síntomas característicos del virus. El tipo de injerto que se utilizó fue injerto de cuña, realizándose a los 20 ddt, cubriendo cada planta con una bolsa plástica por 3 días para mantener la humedad necesaria que requiere el injerto para su crecimiento y desarrollo.

Tabla 2: Plantas de la familia solanaceae injertadas con el geminivirus de Condega

Plantas injertadas	Aislado con el que se injertó
<i>Chiltoma (Capsicum annuum)</i>	Condega
<i>Nicotiana tabacum</i> Cv. Benthamiana	Condega
<i>Nicotiana tabacum</i> Cv. Samsun	Condega
<i>Nicandra physaloides</i>	Condega
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) var. UC-82	Condega

3.4-Fase de Laboratorio de Biología Molecular:

Se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria (U.N.A) Nicaragua y en Suecia en el Departamento De Biología de Plantas en la Universidad Sueca de Ciencias Agrícola (SLU) Uppsala.

3.4.1-Fase de laboratorio de biología molecular UNA

1.Extracción de ADN de tejido de tomate infectado con geminivirus (Método descrito por Wyatt y Brown, 1996).

1. Se extrajeron 0.2 g de tejido infectado y se le agregó 2 ml de Buffer EDTA 10 mM + 50 mM de Tris, luego se maceraron las muestras.
2. Se extrajeron 1.5 ml de la muestra macerada y se colocaron en tubos eppendorf, luego pasaron a una centrifuga Type A 14 Jovan por un tiempo de 10 minutos a 9,000 rpm.
3. Posteriormente se extrajo 50 µl del sobrenadante y se le añadieron a los tubos PCR y se dejaron incubando en hielo por 30 minutos, con el objetivo de fijar las partículas de ADN en las paredes del tubo.
4. Se extrajeron las muestras de los tubos PCR y se lavaron con Tris 50 mM, dos veces cada una con 200 µl y se dejaron secar los tubos para añadirle la reacción PCR y luego colocar 50 µl de la reacción preparada, para posteriormente poner los tubos PCR en la máquina TECHNE PROGENE.

La extracción de ADN de tejido de tomate infectado con geminivirus se sometieron a pruebas de Reacción en Cadenas de Polimerasa (PCR) y electroforesis para detectar la presencia de geminivirus en cada tejido a analizar.

La extracción de ADN se realizó del aislado de Condega. Se realizaron un total de 8 extracciones de ADN en donde se procesaron 29 muestras de tomate infectado con geminivirus, todas corresponden al aislado de Condega incluyendo 5 controles (4 positivos y 1 negativo).

Tabla 3: Extracciones de ADN del aislado de Condega

Nº de Extracción	Aislado de Condega	Control	PCR
1	2	+	-
2	3	+	1(+)
3	2		-
4	5		1(+)
5	4		1(+)
6	4		1(+)
7	4		1(+)
8	5	+	+
		-	
TOTAL	29	4	

2. Técnica PCR

Amplificación de ADN por PCR.

La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) se realiza con el fin de producir múltiples copias de un fragmento de ADN.

La reacción PCR que se usó fue:

Reaction mix with MgCl₂ (Ready Mix Tm Taq PCR) 25 µl

primer Av 494 2.5 µl

primer Ac 1048 2.5 µl

Agua destilada 20 µl

Para un total de 50 µl

Luego se colocaron los 50 µl de la reacción PCR en los tubos PCR y se pusieron en máquina TECHNE PROGENE y se corrió el siguiente programa:

Tabla 4: Programa de 35 ciclos usados en la reacción PCR

Pasos	°C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°	2 min	1 ciclo
Anexión	55°	1 min	35 ciclos
Extensión	72°	2 min	35 ciclos
Extensión final	72°	10 min	35 ciclos

Los “primers” que se usaron para las pruebas fueron Av 494 y Ac 1048 que se utilizan para cortar parte del ADN-A de los geminivirus de Nicaragua (Santa Lucía, Sébaco y Condega) son primers generados para todo un grupo de geminivirus. Permiten obtener un fragmento del ADN viral de 570 nucleótidos (Anexo 6).

3. Electroforesis

La electroforesis se realiza con el objetivo de detectar la presencia de geminivirus en cada tejido a analizar, una vez que termina el programa de la PCR, se prepararon las muestras para colocarse en el gel.

Se colocaron en un tubo eppendorf:

5 µl de la muestra PCR

1 µl de loading buffer

Para un total de 6 µl, estos son colocados en el gel previamente preparado y se corre a 100 V y a 400 mA.

Se hicieron geles de agarosa al 1%, los cuales se pueden elaborar en diferentes tamaños según los moldes ya establecidos y el tamaño del gel dependerá del número de muestras que se quiera evaluar (correr) así como de cada experimento en particular. La agarosa se preparó de la siguiente manera:

300 ml de agarosa al 1%, con 300 ml de buffer TBE, 1ml equivale a 1 g, entonces al utilizar 300 ml de buffer TBE esto es equivalente a 3 g de agarosa.

En un recipiente se añadieron 3 g de agarosa mas 300 ml de buffer TBE, se mezclan, se introducen al horno microondas por 5 minutos aproximadamente, durante el transcurso de

los 5 minutos hay que observar cuando empiece la ebullición e inmediatamente sacarlo, luego se mezcla y se mete de nuevo al horno y así sucesivamente hasta que la agarosa este completamente disuelta y una vez que este disuelta se le agrega 30 µl de bromuro de ethidium (1µl por cada 10 ml) y luego se guarda la agarosa al horno que está a una temperatura de 55 °C.

El buffer TBE se preparó de la siguiente forma: se mezcló en un litro de agua destilada 108 g de Tris, 55 g de ácido Bórico y 9.3 g de EDTA.

TBE, 10X(Tris-borate-EDTA), pH 8.3

El Buffer TBE que utilizamos para la agarosa es 1X.

Luego que el gel se ha corrido se procedió a visualizar las bandas, para verificar la presencia de geminivirus, esta visualización se llevó a cabo con un equipo de luz ultravioleta UVP Uppland, CA 91786 USA, UV transilluminator model M-20, 230 v ~ 50 hz. 0.75 Amps.

3.4.2- Fase de laboratorio de biología molecular Suecia

Pasos:

1. Extracción de ADN de tejido de tomate infectado con geminivirus (Método descrito por Wyatt y Brown, 1996).
2. Amplificación de ADN por PCR.
3. Electroforesis
4. Purificación del Producto PCR.
5. Clonación de ADN.
6. Purificación de plásmidos de ADN.
7. Prueba de digestión enzimática de ADN.
8. Secuencia parcial de ADN del genoma de cada geminivirus.

1.Extracción de ADN de tejido de tomate infectado con geminivirus .

Las extracciones de ADN se hicieron de acuerdo al método descrito por Wyatt y Brown 1996, mencionado anteriormente en la fase de laboratorio de biología molecular U.N.A.

Tabla 5: Extracciones de ADN en los aislados de tomate de Santa Lucía, Condega y Sébaco

No.	Aislado de Condega	Aislado de Santa Lucía	Aislado De Sébaco	Controles positivos
Extracción	Muestras	Muestras	Muestras	Muestras
1	2	2	2	-
2	2	2	2	-
3	2	2	2	-
4	2	2	2	-
5	2	2	2	-
6	2	2	2	-
7	2	2	2	1
8	2	2	2	1
9	2	2	2	2
10	2	2	2	
Total	20	20	20	4

2. Técnica PCR

Se hizo uso de un termociclador PTC-100 el cual se programó de acuerdo al programa que se corrió.

1 Reacción de producto PCR

5 µl buffer 10X

1 µl dNTP

2.5 µl primer PAR 1C 496 10 µM
 2.5 µl primer PAL 1V 1978 10µM
 0.5 µl Taq DNA polymerase (3.5 u/ul)
 38.5 µl de agua. Para un total de 50 µl.

Los “primers” PAR 1C 496 + PAL 1V 1978 fueron usados para cortar una parte (1,200 pares de bases) del componente A (Anexo 6) de los geminivirus de Nicaragua (Santa Lucía, Condega y Sébaco). El programa PCR que se corrió es el siguiente.

Tabla 6: Programa PCR-1 para producto PCR

Pasos	°C	Tiempo	Ciclos
1. Desnaturalización inicial	94	1 min	1
2. Desnaturalización	94	2 min	30
3. Anexión	55	2 min	30
4. Elongamiento	72	2 min	30
5. Extensión final	72	10 min	1

1 Reacción PCR de plásmido de ADN purificado

2.5 µl buffer 10X Reacción Buffer con MgCl₂

1.5 µl MgCl₂

0.5 µl dNTP mix 25 mM

1 µl primer PAR 1C 496 10 µM

1 µl primer PAL 1V 1978 10 µM

0.5 µl Taq ADN polymerase (3.5 u/ul)

16 µl agua estéril

2 µl plásmido disuelto (1:20)

El total de esta reacción es de 25 µl, la que se le añadió a cada tubo PCR.

Tabla 7: Programa PCR-2 para plásmido de ADN purificado

Pasos	°C	Tiempo	Ciclos
1. Desnaturalización inicial	94	2 min	1
2. Desnaturalización	94	1 min	34
3. Anexión	47	2 min	34
4. Elongamiento	72	2 min	34
5. Extensión final	72	10 min	1

3. Electroforesis

El procedimiento fue descrito anteriormente en la fase de laboratorio de la UNA.

Se realizaron diferentes reacciones, estas fueron:

1 Reacción para prueba de Producto PCR

Se realizó de la siguiente manera:

Se colocaron 6 µl en gel por cada muestra:

3 µl muestra

2 µl de H₂O

1 µl loading buffer

El marcador utilizado λ-ADN – Eco RI + Hind III

2 Reacciones para prueba de Producto purificado PCR

Se realizó de la siguiente manera:

Se colocaron 6 µl en gel por cada muestra:

3 µl muestra

2 µl de H₂O

1 µl loading buffer

1 Reacción para prueba de purificación de plásmidos de ADN

5 μ l del producto PCR

1 μ l de loading buffer

Para un total de 6 μ l

1 Reacción para prueba de Digestión enzimática de ADN

Se colocaron 14 μ l en gel por cada muestra:

12 μ l (10 μ l de la Reacción de Digestión enzimática de ADN+2 μ l de plásmido)

2 μ l de loading buffer.

4. Purificación de producto PCR (QIAquick PCR Purification Kit, usando una microcentrifuga)

Se realizó para la eliminación de sustancias extrañas del ADN extraídas por PCR.

Pasos:

1. A la cantidad de cada tubo PCR guardado de las muestras descritas anteriormente se le añadió 5 volúmenes de buffer PB como son 45 μ l guardado de las muestras PCR por 5 μ l de buffer obtuvimos 225 μ l por lo que esta cantidad se le agregó a cada tubo eppendorf.
2. Una vez añadido el buffer se mezcla (vórtex).
3. Se pasaron a columnas (tubos) se centrifugaron por un 1minuto, luego se botó lo que quedó abajo del tubo.
4. Se le añadió buffer PE 725 μ l con ethanol, luego se centrifugó 1minuto, se botó o través lo de abajo (líquido) o buffer, se centrifuga de nuevo para limpiar y luego la columna ya limpia (se cambia de tubo el de abajo) se le añaden 50 μ l de buffer EB (TRIS 10 mM pH 8.5) en el centro de cada tubo, se deja 1minuto y se centrifuga 1minuto y a los tubos se les pone el nombre de PCR purificación, fecha y número de muestra.

5. CLONACION

- a. **Ligamiento (usando un pGEM® -T Easy Vectors):** En este paso se une el fragmento de ADN que se quiere clonar con el vector. El vector que se usó fue un PGEM T easy con el buffer de rápida ligación 2x (PROMEGA). De las muestras de PCR purificadas (ADN Purificado), se escogieron 3 muestras de un total de 6, estas muestras purificadas fueron.

Tabla 8: Muestras de PCR purificadas (ADN purificado)

No. muestra	Código	Localidad
2	SL-4b	Santa Lucía
4	S-1	Sébaco
5	C-1	Condega

Mas un control negativo (NC) como muestra número cuatro.

Reacción de Ligamiento

5 µl buffer 2x

1 µl PGEM-T easy (50 ng)

1 µl T4 ADN ligasa (3 u/ul)

Para un total de 7 µl mas 3 µl de las muestras PCR purificación (ADN Purificado)

Entonces cada tubo llevó 10 µl respectivamente.

Estos reactivos de la reacción se añaden juntos en un tubo eppendorf y se le agregó 7 µl a cada tubo correspondiente marcados con el numero de muestra, posteriormente se le añadieron los 3 µl de las muestras PCR purificación.

Después que cada tubo tiene los 10 µl de la reacción se dejaron en el cuarto frío toda la noche a una temperatura de 4 °C.

b. Clonar (Using Subcloning Efficiency DH5 α^{TM} Competent Cells)

Después que las muestras han pasado toda la noche en el cuarto frío se procedió a realizar la clonación.

Para realizarla fue necesario usar células competentes que se encuentran a una temperatura de menos 70 °C y con estas células se procede a clonar.

Se usaron 2 platos petri con un medio de cultivo LB- Amp (Luria Bertani + ampicilina 50 µg/ml) por cada muestra y como fueron 4 muestras, incluyendo el (BC) se utilizaron 8 platos petri.

PASOS DE LA CLONACION:

1. Añadir 50 µl de células competentes en cada nuevo tubo marcados respectivamente con el número de muestra correspondiente.
2. Añadir 5 µl de los tubos con ADN ligados en el cuarto frío (4 °C).
3. Se dejan incubando en hielo por 30 minutos.
4. En el período en que transcurren los 30 minutos se empiezan a preparar las placas agregándole a cada una 24 µl Aven X-Gal y posteriormente IPTG 28.5 µl. Una vez añadido lo anterior se procede a plaquearla.
5. Transcurrido los 30 minutos los tubos se ponen a temperatura de 37 °C por 20 segundos.
6. Posteriormente se dejaron en hielo por 2 minutos.

7. A los tubos se les añade medio (LB) 950 μ l (0.95 ml) respectivamente.
8. Luego se llevan al cuarto de crecimiento por 1 hora a una temperatura de 37 °C y en movimiento circular.
9. Pasada la hora en el cuarto de crecimiento se procede a la siembra de las bacterias en las placas petri previamente preparadas. De cada muestra se sembró una placa con 100 μ l de bacterias y la solución restante se centrifuga usándose el pellet para la siembra del segundo plato.
10. Luego que todas las placas tienen los 100 μ l y el pellet se guardan en el horno a una temperatura de 37 °C durante toda la noche.

Después que transcurrieron las placas en el horno durante toda la noche estas fueron sacadas del horno y de cada placa se obtuvieron colonias. Posteriormente de cada muestra se tomaron 3 colonias.

Tabla 9: Colonias seleccionadas para la clonación

No. muestra	SL-4B colonias	S-C colonias	C-1 colonias
2	2.1, 2.2, 2.3		
4		4.1, 4.2, 4.3	
5			5.1, 5.2, 5.3

Se usaron 3 placas, cada una subdividida por cada muestra como se describió anteriormente. En un tubo aparte se agrega 3 ml de medio LB mas 1 μ l de ampicilina. Luego se usan 9 tubos de vidrio tres por cada muestra marcados según descrito lo anterior. Entonces se usan 3 ml por cada tubo y como son 9 por lo tanto se obtienen 27

ml, lo que se usa en total, se mezclan en un tubo aparte 30 ml de LB mas 30 µl de ampicilina (100 µg).

Posteriormente a este tubo ya con la mezcla se le extraen 3 ml y se le agrega a cada tubo de vidrio, en donde se le colocó a cada una de las colonia seleccionadas, luego que se le introduce la colonia, esta se pasa a las placas que estan subdividida por cada muestra y se le hace un corte en forma de zig-zag llamado estría. Después que se terminan de estriar cada placa subdividida se colocó en el horno.

Los tubos de vidrio pasan al cuarto de crecimiento toda la noche a una temperatura de 37 °C y en movimiento circular.

c. Purificación de plásmidos de ADN (QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol, usando una microcentrífuga)

Se marcaron 9 tubos del 1 al 9 en donde cada uno, representa cada muestra.

Tabla 10: Plásmidos purificados

SL-4B		S-C		C-1	
No. tubo	muestra	No. tubo	muestra	No. tubo	muestra
1	2.1	4	4.1	7	5.1
2	2.2	5	4.2	8	5.2
3	2.3	6	4.3	9	5.3

Pasos:

1. A cada nuevo tubo se añadió 1.5 ml de la suspensión bacteriana con los clones insertos.
2. Se realizaron 2 centrifugadas cada una de 750 μ l, para que quede solo el pellet y así solo extraer el genoma de la bacteria, se centrifuga por 3 minutos.
3. Cuando solo queda el pellet, después de la centrifugación, se le añadió 250 μ l de buffer P1, luego el pellet se disuelve con el buffer añadido.
4. Una vez disuelto el pellet se le añadió buffer P2 y se le da vuelta al tubo para homogenizar la solución.
5. Posteriormente se le agregó buffer N3 350 μ l se le dio vuelta al tubo y se puso a centrifugar por 10 minutos.
6. El sobrenadante se aplica a las columnas, se centrifuga 1 minuto, se elimina lo que queda abajo de la columna, se le aplica buffer PE 750 μ l se centrifuga 1 minuto, se bota de nuevo lo que queda abajo del tubo, se centrifuga otra vez, se bota el tubo de abajo y se pasa el filtro a los nuevos tubos.
7. Luego se añadió 50 μ l de buffer EB Tris y se dejó 1 minuto y luego se centrifugó 1 minuto y la solución recolectada es el ADN puro.

Medición de la concentración de ADN

Se preparó una dilución 1:50 consistente en 98 μ l de agua y 2 μ l de plásmido. Con esta dilución se midió la concentración de ADN en espectrofotómetro (BECKMAN DU-600).

7. Prueba de digestión enzimática de ADN

Muestras: Cada uno de los clones son sometidos a una prueba de digestión enzimática para ver la presencia del ADN inserto en los clones (Anexo 6).

Se realizó una Reacción:

2.0 µl Gem-clone(plásmido)

1.2 µl Eco R1 buffer 10 X

0.5 µl Eco R1 enzima 10 u/µl

8.3 µl de agua purificada

Total de 12 µl por cada tubo/muestra

Las reacciones preparadas se pusieron en el horno a una temperatura de 7 °C por un tiempo de dos horas y media. Luego se corrió un gel y cada tubo que tiene sus 12 µl se les agregó 2 µl de loading buffer para un total de 14 µl por cada muestra.

8. SECUENCIACION

Secuencia

De los 9 clones purificados puestos a prueba de digestión de enzimas se tomaron sólo 3 muestras 1, 5 y la 7 respectivamente, y posteriormente fueron secuenciados.

Muestra 1 corresponde a Santa Lucía (SL-4B)

Muestra 5 corresponde a Sébaco (S-C)

Muestra 7 corresponde a Condega (C-1)

De estas tres muestras se hicieron seis secuencias o sea dos para cada muestra. Una secuencia usando primers forward (fw) y una secuencia usando primer reverse (rv).

El tubo No 1 pertenece a la muestra numero 1 Santa Lucía. SL-4B

El tubo No 2 pertenece a la muestra numero 5 Sébaco S-C

El tubo No 3 pertenece a la muestra numero 7 Condega C-1

Estos tres primeros tubos usaron primers Fw.

El tubo No 4 pertenece a la muestra numero 1 Santa Lucía SL-4B

El tubo No 5 pertenece a la muestra numero 5 Sébaco S-C

El tubo No 6 pertenece a la muestra numero 7 Condega C-1

Estos tres últimos tenían primers Rv.

Reacción PCR de secuenciación

Muestras	Plásmidos	premix	Primer	Agua (E)	total
1 (FW)	1 µl	8 µl	1 ul	10 µl	20 µl
2 (FW)	1 µl	8 µl	1 ul	10 ul	20 µl
3 (FW)	1 µl	8 µl	1 ul	10 ul	20 µl
4 (Rv)	1 µl	8 µl	1 ul	10 ul	20 µl
5 (Rv)	1 µl	8 µl	1 ul	10 ul	20 µl
6 (Rv)	1 µl	8 ul	1 ul	10 ul	20 µl

Las muestras se pusieron en la máquina PTC-100 y se corrió el programa utilizado para la secuenciación.

Tabla 11: Programa PCR para secuenciación de ADN

Pasos	°C	Tiempo	Ciclos
1	95	20 seg.	30
2	50	15 seg.	30
3	60	60 seg.	30

Pasos secuenciación

1. Una vez que termina la PCR se marcan 6 tubos y se les agrega 2 μ l buffer acetate de sodium EDTA.
2. Agregarles los 20 μ l que estan en los tubos PCR una vez finalizado los ciclos.
3. Añadir 80 μ l de ethanol 95% a cada tubo, se mezcla en el agitador, se centrifuga 15 minutos a 12000 rpm.
4. Luego se aspira el sobrenadante y se le añade a los tubos 300 μ l de ethanol 70%, se centrifuga 1 minuto aproximadamente, se bota el alcohol, se aspira y se deja 10 minutos en una lámpara de luz con el objetivo de que el pellet quede completamente seco y adherido a las paredes del tubo.
5. Posteriormente se le agrega buffer loading DYE 4 μ l a cada tubo, luego se pone en el agitador 20 segundos se centrifuga 1 minuto y se van a dejar los tubos con las muestras al lugar donde posteriormente harán la secuenciación.

El análisis de las secuencias de los geminivirus se realizó a través del programa DNASTAR el cuál indica los porcentajes de identidad en los geminivirus de Condega, Santa Lucía y Sébaco.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1- Porcentaje de transmisibilidad del geminivirus de condega

Después que las plantas fueron inoculadas presentaron los primeros síntomas a los 13 días. El porcentaje de transmisión obtenido de la colonia de mosca blanca al adquirir el geminivirus de Condega fue de 45%, lo que indica que para asegurar la transmisibilidad del virus fue necesario usar 5 moscas por planta, debido que al utilizar esta cantidad de moscas garantizamos que al menos 2 moscas sean infectivas, permitiendo asegurar que el virus infecte a plantas sanas.

4.2- Período de adquisición

El análisis estadístico indicó que los tratamientos no difieren entre sí. De los 13 tratamientos de adquisición solamente en los períodos de 2 y 5 minutos el vector no fue capaz de adquirir y transmitir el virus, por lo tanto se estableció que el período mínimo de adquisición fue el tratamiento 3 de acuerdo a la Tabla 12, correspondiente al período de 10 minutos. Lo que significa que la mosca fue capaz de adquirir el virus tanto en 10 minutos como en 48 horas, pues no se cuantificó la cantidad de virus que adquirió la mosca blanca, solo se confirmó si hubo o no adquisición.

Según los porcentajes calculados en los diferentes períodos de adquisición, realizados en las 3 repeticiones los resultados obtenidos fueron que los períodos de 12 y 48 horas tuvieron un mismo porcentaje de 60% siendo el más alto en comparación con los otros tratamientos y que los más bajos fueron los períodos de 10 minutos, 2 horas, 4 horas, 10 horas siendo para estos tiempos el mismo porcentaje de 40% (Tabla 12).

El rango entre los diferentes períodos de adquisición no variaron mucho pues oscilaron entre un 40% y 60 % por lo que no hubo diferencia significativa entre ellos (Figura 1).

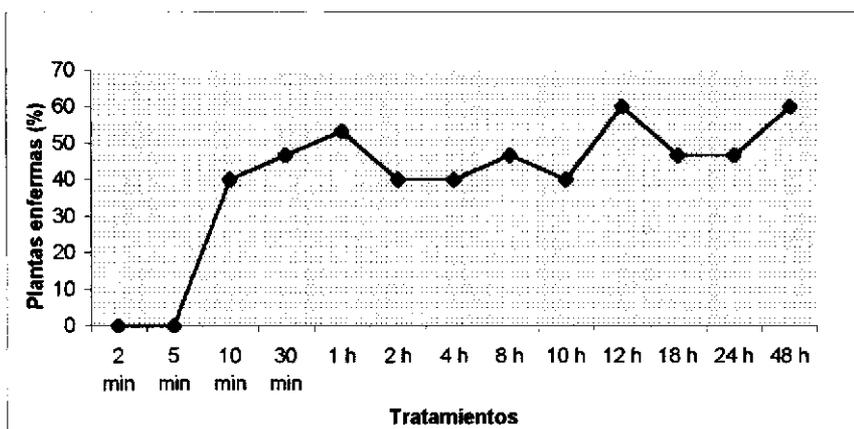


Figura 1. Porcentaje de plantas enfermas en los diferentes periodos de adquisición.

Según estudios realizados con otro tipo de geminivirus como el virus del mosaico amarillo del tomate (TYMV), los resultados obtenidos fueron de un período mínimo para adquirir y transmitir el virus de 4 horas con un porcentaje de 25% de transmisión (Bonilla, 1995). Además, Lastra (1993) encontró que el período mínimo de adquisición fue de 4 horas en el cultivo del tomate coincidiendo dichos resultados entre sí. En el presente estudio los datos muestran que la mosca blanca necesitó de un período mínimo de adquisición de 10 minutos con un 45% de transmisión del virus lo que indica que el vector de acuerdo al geminivirus que transmita tiene diferentes patrones de transmisión.

Los períodos mas bajos fueron de 24 horas, esto se debió a que se colocó solamente un adulto de mosca blanca por planta. Aunque un solo adulto puede transmitir el virus del TYMV, la transmisión es baja, aproximadamente 7 adultos por planta aseguran el 100% de transmisión (Verma *et al.*, 1975), lo que permite tener resultados muy diferentes en comparación al presente estudio, pues en este experimento se usaron 5 moscas por planta.

Una investigación realizada por Zeledón, (2002) (datos sin publicar) con el geminivirus de Sébaco indica que la mosca blanca necesita alimentarse, para adquirir el virus de una planta infestada un mínimo de 10 minutos y que el tiempo mas efectivo de adquisición fue de 30 minutos y 18 horas con un 66% de infectividad. Otras investigaciones demuestran que *B. tabaci* requiere un mínimo de 10 minutos para adquirir geminivirus de

plantas infectadas según estudios realizados en BGMV (Virus de mosaico dorado del frijol) por Morales (1994), coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio.

En estudios realizados con geminivirus de Santa Lucía indican que la mosca sólo requiere un tiempo mínimo de 10 minutos de alimentación para adquirir el virus, presentándose menor porcentaje de infectividad de 10% y que un tiempo eficiente para adquisición fue de 48 horas con un porcentaje del 60%, Salinas (2002) (datos sin publicar), lo que demuestra que se enfermaron mas plantas con respecto al periodo mínimo. En el presente trabajo el geminivirus se comportó de manera diferente, debido a que los resultados demuestran que los tiempos donde el vector más adquirió el virus fueron en los tiempos de 12 y 48 horas (60%) y que los menores tiempos de adquisición fueron de 10 minutos, 2, 4, 10 horas con un (40%).

Tabla 12: Alimentación del vector en diferentes tiempos, sobre una planta enferma para que adquiera el virus para transmitirlo a plantas sanas (Periodo de adquisición).

Tiempo de alimentación en plantas enfermas	Tratamiento	Plantas inoculadas	No de moscas por planta	Plantas con síntomas	Plantas infectadas (%)
2 min	T1	15	5	0	0
5 min	T2	15	5	0	0
10 min	T3	15	5	6	40
30 min	T4	15	5	7	46.66
1 hora	T5	15	5	8	53.33
2 horas	T6	15	5	6	40
4 horas	T7	15	5	6	40
8 horas	T8	15	5	7	46.66
10 horas	T9	15	5	6	40
12 horas	T10	15	5	9	60
18 horas	T11	15	5	7	46.66
24 horas	T12	15	5	10	46.66
48 horas	T13	15	5	9	60

4.3-Período de inoculación

Se realizaron 13 tratamientos de inoculación en donde el tratamiento 1 y 2 (2 y 5 minutos) la mosca blanca no fue capaz de transmitir el virus, por lo tanto se estableció que el período mínimo de inoculación fue el tercer tratamiento de acuerdo a la Tabla 13, correspondiente a los 10 minutos.

Entre los periodos o tiempos de inoculación el que presentó el porcentaje más alto de transmisión fue el período de 24 horas y 48 horas ambos con un porcentaje de 66.66% (Figura 2). De los tiempos en que se observó síntomas el que menos porcentaje de transmisión tuvo fue el de 1 hora con un 13.33% (Tabla 13).

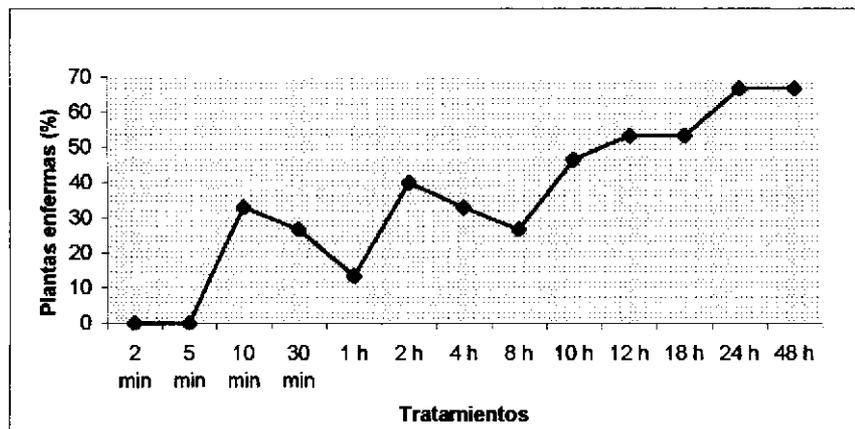


Figura 2. Porcentaje de plantas enfermas en los diferentes períodos de inoculación.

Los bajos porcentajes de transmisión en los tratamientos quizá se debieron a que las moscas no comenzaron a alimentarse al mismo tiempo en los brotes del aislado, por lo tanto no tuvieron la alimentación necesaria para adquirir el virus ni mucho menos para transmitirlos a plantas sanas, otro aspecto a considerar es que en experimentos de transmisión con hembras y machos se ha probado que las hembras son más eficientes que los machos (Uzcátegui y Lastra, 1978; Bock, 1982). La razón de porqué las hembras de moscas blancas son más eficientes con la transmisión de geminivirus, no se conoce aún, pero parece lógico esperar que la mayor actividad metabólica debido a la producción de

huevos, hacen que la toma de alimento de la hembra, sea en mayor grado y liberando grandes cantidades de virus, durante la alimentación (Costa y Bennet, 1950).

En Venezuela se logró obtener 95% con éxito en la transmisión con hembras contra 75% de transmisión con machos (Uzcátegui y Lastra, 1978), por lo tanto al tomar las moscas del criadero al azar no se garantizó la obtención únicamente de hembras en el presente trabajo.

Según estudios realizados con otros geminivirus como el Mosaico Amarillo del Tomate (TYMV) se determinó que el periodo de transmisión más efectivo fue el de 4 horas con un porcentaje de transmisión de 25%. Y que curiosamente a los 20 y 24 horas el porcentajes de transmisión fue inesperadamente bajo, pues después de cierto tiempo la cantidad de partículas virales circulando en el vector es menor (Bonilla, 1995).

Estudios con BGMV (Virus del mosaico dorado del frijol) realizados por Rojas *et al.*, (1993), han demostrado resultados similares al presente trabajo, ya que los primeros síntomas en las plantas inoculadas con el virus de Condega iniciaron a los 10 y 12 días y en las plantas de frijol inoculadas con el BGMV iniciaron los síntomas a los 10 días resultando en este caso los mejores tratamientos los periodos de 24 y 48 de inoculación, debido a que presentaron mayor porcentaje de plantas enfermas coincidiendo estos datos con dicho experimento.

Datos obtenidos por Salinas, 2002 (datos sin publicar), trabajando con el geminivirus de Santa Lucía-Boaco determinó que el tiempo más efectivo de transmisión del virus fue de 18 y 24 horas de inoculación con un porcentaje de 60% y que el menor tiempo de infectividad que tuvo el vector en transmitir el geminivirus a plantas sanas fue de 10 minutos con un porcentaje de 10%.

Comparando los resultados obtenidos en el presente estudio con el geminivirus de Sébaco, demuestran que el vector de este geminivirus necesita un tiempo mínimo de alimentación de 10 minutos para transmitir el virus y que el tiempo o periodo con más

eficiencia de transmisión corresponden a 4 y 8 horas de inoculación, debido a que 10 minutos representa el tratamiento con menor infectividad con un 6.6% y que los tiempos de 4 y 8 horas resultaron con un 66.6% Zeledón, (2002) (datos sin publicar), estos resultados permiten observar y comparar que el geminivirus de Sébaco se asemeja a un mismo porcentaje de infectividad (66.6%) al geminivirus de Condega, pero con la diferencia que este geminivirus obtuvo el 66.6% en los periodos de 24 y 48 horas de inoculación y no en los tiempos de 4 y 8 horas.

Tabla 13: Período de inoculación del geminivirus en plantas de tomate expuestas a *B. tabaci*.

Tiempo de alimentación en plantas enfermas	Tratamiento	Plantas inoculadas	No moscas por planta	Plantas con síntomas	Plantas infectadas (%)
2 min	T1	15	5	0	0
5 min	T2	15	5	0	0
10 min	T3	15	5	5	33
30 min	T4	15	5	4	26.66
1 hora	T5	15	5	2	13.33
2 horas	T6	15	5	6	40
4 horas	T7	15	5	5	33
8 horas	T8	15	5	4	26.66
10 horas	T9	15	5	7	46.66
12 horas	T10	15	5	8	53.33
18 horas	T11	15	5	8	53.33
24 horas	T12	15	5	10	66.66
48 horas	T13	15	5	10	66.66

4.4-Período de retención

Los resultados del geminivirus en estudio indican que el vector conservó su capacidad de transmisión del virus hasta el sexto día, por lo que hubo una gran variación en la eficiencia de la transmisión del virus (Figura 3), pues una característica de la mayoría de los geminivirus es la inconsistencia de su patrón de transmisión, porque al haber inoculaciones sucesivas exitosas, el vector puede fallar al transmitir, pero recobrar la habilidad para hacerlo después (Bock, 1982).

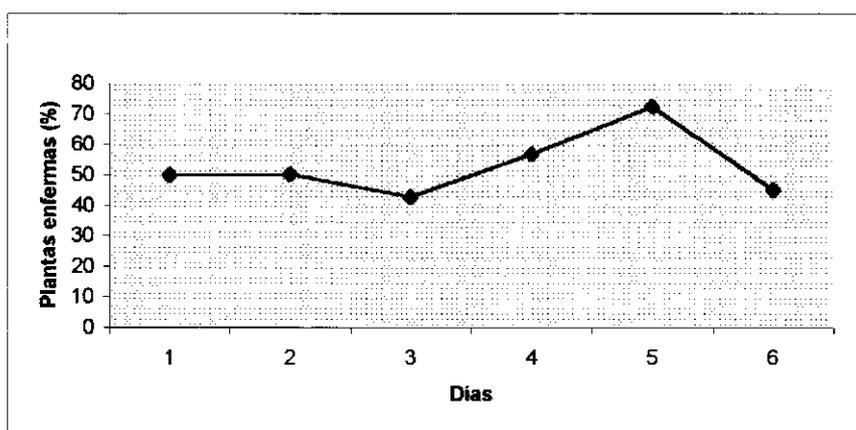


Figura 3. Porcentaje de plantas enfermas en los diferentes días de retención.

Bemisia tabaci transmite el TYLCV en forma persistente circulativa, pero no persiste durante toda la vida del adulto (Cohen y Nitzany, 1966).

La transmisión del virus, sin una nueva adquisición en el vector se comportó de una manera muy variable, pues el porcentaje de infectividad por día del vector cambia de un día a otro, por lo que no se puede determinar ni garantizar la concentración de virus en el vector (Tabla 14).

Tabla 14: Período de retención del geminivirus en plantas de tomate expuestas a *B. tabaci*

Días de retención	% de transmisión
1	50
2	50.11
3	42.82
4	56.85
5	72.5
6	45.07

La transmisión del geminivirus en el periodo de retención varía de un día a otro y no se puede determinar una relación directa entre cada día, debido a que las moscas blancas que utilizamos las tomamos al azar, sin tomar en cuenta la edad, ya que a medida que los días pasan, las moscas van perdiendo su capacidad de transmisión sus actividades metabólicas disminuyen y por lo tanto la concentración de partículas virales también, otro factor es la proporción hembras-machos, la razón de porqué las hembras de moscas blancas son mas eficientes con la transmisión de geminivirus (Costa y Bennet, 1950).

Otros estudios con el geminivirus de Sébaco han demostrado que la mosca es capaz de retener el virus por 7 días y su porcentaje de transmisión disminuye a medida que pasan los días Zeledón, (2002) (datos sin publicar).

Estos datos permitieron comparar la capacidad de retención de cada geminivirus mostrando que son diferentes, por lo que comparando resultados demuestran que los días se asemejan a dichos estudios.

A medida que se van realizando investigaciones con otros geminivirus como el de Santa Lucía, señala que la mosca es capaz de retener las partículas del virus por 5 días Salinas, (2002) (datos sin publicar), siendo un porcentaje más bajo en comparación al geminivirus de Condega y Sébaco, según este geminivirus el comportamiento de infectividad por días

varió al igual que los otros virus estudiados. Gámez (1971), encontró que *B. tabaci* puede retener el BGMV por un período tan largo como 21 días.

4.5- Rango de hospedantes

La planta con PCR (+) señala la presencia de virus, ya que al hacer uso de la técnica de electroforesis con la realización de un gel corrido, se visualizaron las bandas, donde se verificó la presencia de geminivirus en la especie *Nicotiana tabacum* Cv. *Benthamiana* la cuál presentó síntomas más severos y visibles del geminivirus de Condega.

Tabla 15: Resultados de la prueba PCR realizadas en laboratorio de biología molecular de la UNA en especies de la familia solanáceas injertadas con el geminivirus de Condega

Plantas injertadas	Aislado con el que se injertó	PCR
Chiltoma (<i>Capsicum annuum</i>)	Condega	-
<i>Nicotiana tabacum</i> Cv. <i>Benthamiana</i>	Condega	+
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) var. UC-82	Condega	-

4.6-Fase de invernadero

Se encontraron diferencias significativas en unos casos y altamente significativas en otros, para los factores fecha y materiales, cuyas probabilidades respectivas fueron: para el tratamiento 1 ($P \geq 0.005$ y 0.0001), el tratamiento 2 ($P \geq 0.0001$ y 0.0001) y para el tratamiento 3 ($P \geq 0.0036$ y 0.0098).

La interacción fecha por material indica que no hay diferencias significativas en los tres tratamientos, por lo que cada factor es independiente entre sí (Anexo 9, 10 y 11).

En el tratamiento 4 (plantas sin inocular) podemos señalar que los materiales testigos no fueron infectados debido a que no se les inoculó el geminivirus y por lo tanto ninguna de las plantas presentaron síntomas ante la ausencia del virus.

Con respecto a la variable evaluada (severidad) en cada uno de los tratamientos, el material más afectado fue la variedad UC-82 debido a que sus porcentajes de severidad fueron de 60% en el tratamiento 1 y 40% en el tratamiento 2 y 3 (Figura 4).

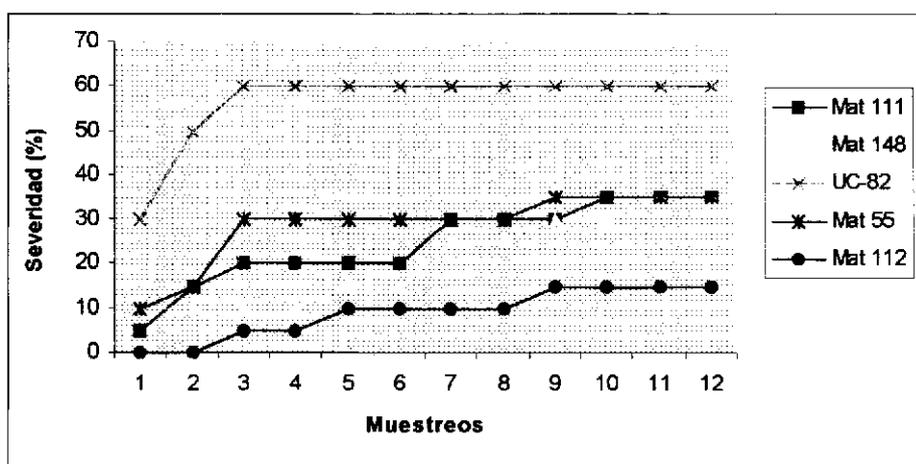


Figura 4. Porcentaje de severidad de los materiales inoculados a los 7 ddt.

Comparando estos tres tratamientos podemos observar que la UC-82 disminuyó el porcentaje de severidad de un 60% a un 40% (Figura 5) pues las plantas tenían más edad y la susceptibilidad de las plantas al geminivirus disminuye a medida que las plantas maduran fisiológicamente (Hilje y Arboleda, 1993).

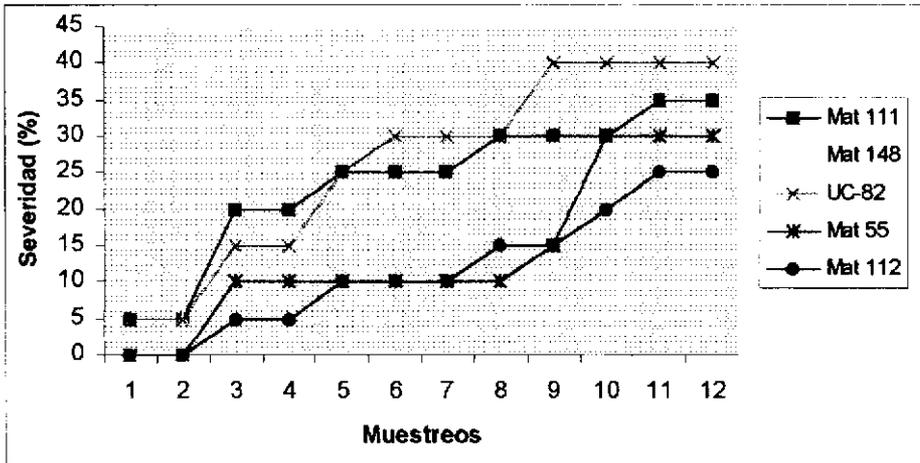


Figura 5. Porcentaje de severidad de los materiales inoculados a los 14 ddt.

Los materiales menos afectados severamente fueron el 112 en el tratamiento 1 y 3 con 15 y 25% respectivamente y el material 148 en el tratamiento 2 con 5% de severidad según la escala utilizada. (Figura 6).

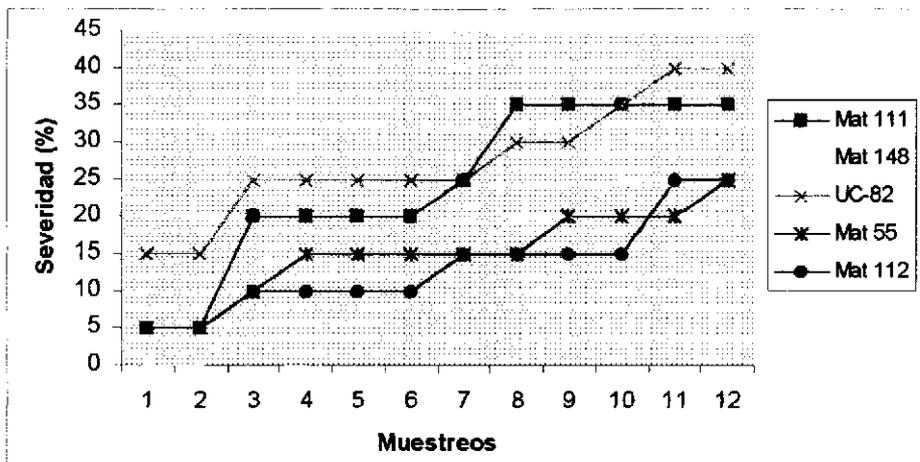


Figura 6. Porcentaje de severidad de los materiales inoculados a los 21 DDT.

4.7-Fase fuera del invernadero

4.7.1- Severidad del geminivirus en los materiales evaluados.

El ANDEVA denota que existe diferencias altamente significativas entre las fechas ($P \geq 0.0001$) al igual que en los materiales existe diferencias significativas ($P \geq 0.001$), sin embargo, en la interacción fecha por material no existe diferencias significativas ($P \geq 0.6029$). Ambos factores son independiente entre sí, para el comportamiento de la severidad cada uno de los factores no está influenciado uno sobre el otro resultando en el análisis un R^2 de 0.915474 con un coeficiente de variación de 21.3206 (Anexo 12).

Los materiales se comportaron en el campo de manera diferentes, la variedad UC-82 fue la que presentó mayor cantidad de plantas enfermas y mayor porcentaje de severidad 58.75%, con síntomas muy severos, observándose plantas arrugadas, cloróticas, enanas y con frutos muy pequeños, moteados y con maduración desuniforme (Figura 7).

El mejor material ante el ataque de mosca blanca fue el material 55 con 40% pues presentó menos plantas enfermas y en menor escala de acuerdo a la severidad, siendo un material resistente ante la virosis, aunque ninguna variedad es resistente a todas las plagas y enfermedades a la vez (CATIE, 1990).

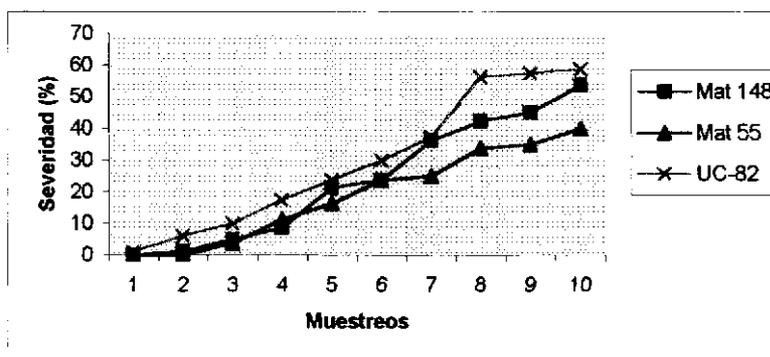


Figura 7. Porcentaje de severidad de geminivirus en los materiales evaluados.

Un factor metodológico que podría haber afectado los resultados, y la explicación de lo que sucede en el campo, es que en el invernadero los síntomas virales generalmente son

mas leves, pues las condiciones climáticas son más benignas que en el campo (Bonilla, 1995).

4.7.2- Incidencia del complejo mosca blanca-geminivirus en los materiales evaluados.

El ANDEVA realizado demuestra que se encontró diferencias altamente significativas ($P \geq 0.0001$) entre las fechas de muestreos de acuerdo a la variable incidencia, el factor material no mostró efecto significativo entre los materiales ($P \geq 0.1015$) al igual que en la interacción fecha por material no hay diferencia significativa ($P \geq 0.4009$), ya que ambos factores son independiente entre sí. Resultando en el análisis un R^2 de 0.876599 con un coeficiente de variación de 25.06113 (Anexo 13).

Los materiales no difieren mucho uno sobre el otro porque los tres materiales evaluados presentaron síntomas. En los primeros muestreos realizados la variedad UC-82 presentó mayor incidencia de virosis en comparación con los otros materiales y a partir del muestreo 7 todos los materiales tuvieron 100% (Figura 8).

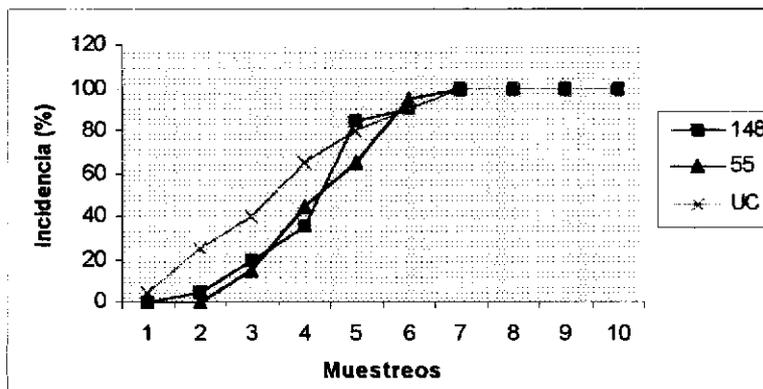


Figura 8. Porcentaje de incidencia de geminivirus en los materiales evaluados.

Experimentos realizados sobre incidencia de virosis en cultivares como Ty-8472, Ty-8484, Ty-5656, Ty-8479, XPH-5979 y UC-82 demostraron que los cultivares UC-82 y Ty-8479 presentaron mayor incidencia de virosis, no obstante el cultivar UC-82 presentó el menor número de adultos de mosca blanca, tanto en semillero como en plantación lo que indica que este cultivar es muy susceptible a la virosis y no se debe de establecer en

localidades con alta presión de insecto. Los cultivares de origen israelitas Ty-8472, Ty-8484 así como el de origen estadounidense XPH-5979 presentaron mayor grado de tolerancia, (Castilla y Castilblanco, 1998).

Otros estudios que se han realizados sobre incidencia de virosis en diferentes variedades como UC-82, Peto-95, Río Grande demuestran que la variedad Río Grande tiene el promedio más alto de incidencia de virosis en comparación con las demás (Olivas, 1996).

Al comparar los porcentajes de severidad e incidencia en los materiales se comprobó que aunque todas las plantas se enfermaron no presentaron el mismo grado de sintomatología, debido que cada material respondió de manera diferente ante la infección.

4.7.3- Promedio de mosca blanca en los materiales evaluados.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza realizado para la mosca blanca muestran que existe diferencia significativa entre las fechas ($P \geq 0.01$) igualmente el factor material mostró efecto altamente significativo entre los materiales ($P \geq 0.0001$) sin embargo en la interacción fecha por material no hubo diferencias significativas ($P \geq 0.1316$), ya que ambos factores son independiente sí, con un coeficiente de variación de 20.59 y un R^2 de 0.53 (Anexo 14).

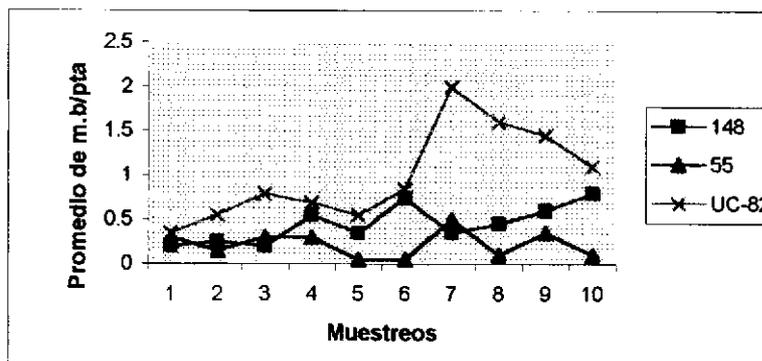


Figura 9. Dinámica poblacional de mosca blanca en los materiales evaluados.

La figura 9 muestra que la variedad UC-82 obtuvo como promedio 2 adultos por planta , resultando ser la que presentó mayor número de mosca en comparación con los demás materiales.

B.tabaci Gennadius es una plaga estacional cuyo impacto más severo se presenta en la estación seca, los adultos tienen la capacidad de invadir rápidamente sus cultivos preferidos, favorecidos por la dirección del viento, lo que representan un reclutamiento muy intenso de éstos en el envés de la hoja, en grupos de tamaños variables, presentan una mayor actividad en horas de la mañana entre las 6:30 a.m – 8:30 a.m y por la tarde entre las 3:30 – 5:30 p.m. (Hilje *et al* .,1992) (citado por Castilla y Castilblanco, 1998).

Experimentos realizados sobre población de mosca blanca en cultivares como Ty-8472, Ty-8484, Ty-5656, Ty-8479, XPH-5979 y UC-82 indicaron que la mayor presencia de mosca blanca en la plantación la obtuvieron los cultivares Ty-8484 y Ty-8472, mientras que el cultivar XPH-5979 manifestó menor presencia del vector. Los cultivares de origen israelitas Ty-8472, Ty-8484 demuestra la preferencia que tiene el insecto tanto en estado de plántula como en plantación definitiva, por lo que se les debe dar un buen manejo agronómico y fitosanitario (Castilla y Castilblanco, 1998).

4.8- Caracterización molecular

Después de la purificación de los plásmidos se midió la concentración de ADN, (Tabla 16) donde se sometieron a una prueba PCR y prueba de digestión enzimática de ADN en la cuál se verificó la presencia del ADN viral inserto en los clones.

Tabla 16: Concentración de ADN de los plásmidos purificados

Muestras	Clones	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
SL-4B	1	10.61	0.53
	2	9.42	0.46
	3	10.32	0.51
S-C	4	9.61	0.48
	5	10.62	0.53
	6	10.06	0.50
C-1	7	11.96	0.59
	8	11.45	0.57
	9	4.2	0.21

El fragmento secuenciado del componente A de los geminivirus de Condega, Santa Lucía y Sébaco fue de 1200 pares de bases abarcando la Región Común (RC), la proteína de cápside (AV1) y la proteína de replicación (AC1) (Anexo 7), revelando similitud en la secuencias de los nucleótidos, el análisis de las secuencias en los porcentajes de similitud indican que el geminivirus de Sébaco con el de Condega tiene 89.0 de similitud y con Santa Lucía 95.2, igualmente el geminivirus de Condega con el de Santa Lucía tiene 91.8 de similitud, mostrando mayor porcentaje Sébaco con Santa Lucía (Tabla 17).

Tabla 17: Porcentaje de similitud de la secuencia de los geminivirus de Condega, Santa Lucía y Sébaco

SECUENCIAS	PORCENTAJES DE SIMILITUD
Geminivirus de Condega con Sébaco	89.0 %
Geminivirus de Sébaco con Santa Lucía	95.2 %
Geminivirus de Condega con Santa Lucía	91.8 %

CONCLUSIONES

1. El porcentaje de infectividad de la colonia de mosca blanca en la transmisión del virus de Condega fue de 45%.
2. El período de adquisición mínimo fue de 10 minutos, los tiempos de mayor eficiencia de adquisición fueron el de 12 y 48 horas (60%) y los que obtuvieron menores porcentajes fueron los tiempos de 10 minutos, 2, 4 y 10 horas (40%).
3. El período mínimo de inoculación fue de 10 minutos, de los periodos de inoculación los de 24 y 48 horas presentaron el mayor porcentaje de transmisión (66.66%) y el período de 1 hora el menor porcentaje (13.33%).
4. El período de retención del vector en su capacidad de transmisión del virus fue de 6 días, siendo el día 5 el que presentó mayor porcentaje de infectividad con 72.5%.
5. De las cinco especies de la familia solanáceas injertadas, resultó con síntomas la especie *Nicotiana tabacum* CV. *Benthamiana*.
6. De los 5 materiales evaluados en el invernadero en los diferentes períodos de inoculación, el material 112 fue el que resultó más resistente ante el complejo, ya que comparando los porcentajes de severidad con el resto de materiales fue el menos afectado y la variedad UC-82 fue la mas susceptible, debido a que presentó mayor número de plantas enfermas con síntomas muy severos.
7. De los tres materiales evaluados en la fase fuera de invernadero incluyendo la testigo UC-82, resultó el material 55 con el menor porcentaje de severidad (40%) siendo el material que mejor se comportó ante el complejo mosca blanca-geminivirus, mostrando ser mas resistente respecto a los demás materiales, la variedad UC-82 fue la mas susceptible, debido a que presentó mayor porcentaje

de severidad (58.75%). De igual forma el material 148, 55 y la UC-82 resultaron en los muestreos finales con igual porcentaje de incidencia 100% y en la dinámica poblacional de mosca blanca resultó la variedad UC-82 con mas adultos (2) por planta en comparación con el resto de materiales.

8. La secuencia del fragmento 1200 pares de bases del componente A de los geminivirus de Condega, Santa Lucía y Sébaco, permitió conocer a través de la secuencia de nucleótidos, los porcentajes de similitud que existen entre ellos, obteniéndose como resultado que el geminivirus de Sébaco con Santa Lucía alcanzó un mayor porcentaje de similitud con un 95.2 en comparación con el geminivirus de Condega (89.0%).

VI-RECOMENDACIONES

1. Uso de variedades tolerantes y resistentes utilizados de forma directa por los productores o como fuente de genes para trabajos de mejoramiento genético.
2. Tomando como referencia que el período mínimo de adquisición e inoculación obtenido en esta investigación fue de 10 minutos y que el último tratamiento observado fue de 48 horas, se deben llevar a cabo estudios mas prolongados en cuanto a los diferentes tiempos de alimentación del vector, para determinar si es capaz de adquirir y transmitir el virus en mayor valor del mencionado anteriormente.
3. Al realizarse trabajos con períodos de inoculación y adquisición recomendamos utilizar de 10-15 moscas, debido al tamaño de las trampas, para evitar que las moscas se mueran.
4. Se recomienda tener en el invernadero la cantidad suficiente de plantas, para reemplazar aquellas que se dañen al momento de ser utilizadas en los diferentes periodos de adquisición, inoculación y retención.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- BELDER, D.E. 1986.** Virología agrícola. Universidad Agrícola de Wageningen, Holanda. P, 59.
- BOCK, K.R. 1982.** Geminiviruses diseases. *Plant Disease* 66(3): 266-270.
- BONILLA, F. 1995.** Períodos de adquisición, latencia y transmisión de un geminivirus en tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill), por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) (homóptera aleyrodidae). Tesis (para optar al título de Ing. Agr. en el grado académico de Lic. en Agronomía con énfasis en producción). Universidad de Costa Rica, Sede Regional del Atlántico. Turrialba, Costa Rica. p 11-13.
- BROWN, J. K. 1997.** The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. Pages 125-195 in: *Plant-Microbe Interactions*. G. Stacey and N. T. Keen, eds. Chapman & Hall, New York.
- BROWN, J. K. & BIRD, J. 1992.** Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. *Plant Dis.* 76:220-225.
- CASTILLA CASTRO, C DEL C.; CASTILBLANCO DAVILA, C. 1998.** Evaluación de cinco cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), en el Valle de Sébaco, Matagalpa. Tesis (Ing. Agr.) Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. p. 9-11.
- COHEN, S.; NITZANY, F. 1966.** Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56:1127-1131.

- COSTA, A.S.; BENNET, C. 1950.** Whitefly transmitted mosaico *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology*. 40:266-283.
- DITTRICH, V.S. UK.; G.H, ERNEST. 1990.** Chemical control and insecticida resistance of whiteflies. In D. Gerling. Ed. *Whiteflies: The bionomics pest status and manegement nescatle, UK, athenaeum.p.263-273.*
- DUFFUS, J.; LARSEN, R .; LIU, H. 1986.** Lettuce infectious yellous virus – A new type of whitefly – transmitted virus. *The American Phytopathological Society.*
- GAMEZ, L. 1971.** Los virus del frijol en Centroamérica. Transmisión por mosca blanca *Bemisia tabaci* Genn y plantas hospedantes del virus del mosaico dorado del frijol. *Turrialba*. 21: 22-27.
- GERLING, D. 1990.** Natural enemies of whiteflies: predatos and parasitoids. In D. Gerling. Ed. *Whiteflies: Their bionomics, pest status and management.* Intercept Ltd. England. P 348.
- GUHARAY, F. 1994.** Bioecología de mosca blanca *Bemisia tabaci*: resultados de los estudios realizados en Nicaragua. En *Biología y manejo del Complejo mosca blanca- virosis*. M de mata,; D. E. Dardón, A.; V. E. Salguero, N. (Edts). Memoria III Taller Centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca, Guatemala. P.73-84.
- HILJE, L. y ARBOLEDA, O. 1993.** Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidea) en America Central y el Caribe. Serie Técnica. Informe Técnico No. 205. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p 18-55.
- HILJE, L. 1994.** Aspectos Bio-ecológicos de *Bemisia tabaci* en Mesoamérica. En *Biología y manejo del Complejo mosca blanca-virosis*. Taller Centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca (3; 19-23 de Septiembre. 1994. Antigua,

Guatemala). (Memoria). Mata, M.; D. E .Dardón, A.; V. E Salguero, N. (Edts). Antigua, Guatemala. P:54-56.

INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria).1999. Guía tecnológica del cultivo del tomate. Nicaragua. p, 2-11.

INETER (Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales). 2001. Revista Amunic. El municipio de Managua. INIFOM (Instituto Nicaragüense de Fomento Municipal) , Managua, Nicaragua. P, 38.

LASTRA, R. 1993. Los geminivirus: un grupo de fitovirus con características especiales en Las Moscas blancas (Homóptera: Aleyrodidae) en América Central y El Caribe. Luko Hilje y Orlando Arboleda (Edts), CATIE, Turrialba, Costa Rica. p.16-19.

LAZAROWITZ, S. G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. Crit. Rev. plant Sci. 11:327-349.

MORALES, F.J. 1994. Mosaico Dorado del Frijol Bean Golden Mosaic, Avances de Investigación Research Advances. CIAT, Cali, Colombia, PROFIJOL – COSUDE. P.1-5.

OLIVAS, RIVERA, M. 1996. Evaluación agronómica de 4 variedades de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) con dos técnicas diferentes para el manejo del complejo mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn) y geminivirus. Tesis (Ing. Agr). Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. p, 23.

PADIDAM, M .; MAXWELL, D. P.; y FAUQUET, C. M. 1997. A proposal for naming geminiviruses. Arch. Virol. 142:2553-2562.

PEDROZA, H. 1993. Fundamentos de experimentación agrícola. Centro de Estudios De Ecodesarrollo Para El Trópico (CECOTROPIC), Managua. P, 140-148.

REDCAHOR (Red Colaborativa de investigación y Desarrollo de Hortalizas para América Central , República Dominicana y Panamá, 1999) y modificada por Rojas (2000).

ROJAS, A.; VALLE, N.; ANDERSON ,P. 1993. Proyecto: Determinación del período crítico del virus del mosaico dorado (BGMV), eficiencia de la transmisión por su vector , *Bemisia tabaci* (Genn.) y nivel de infectividad del vector en campos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Nicaragua. Universidad Nacional Agraria. p, 1-5.

ROJAS, A. 1993. Aspectos Bioecológicos de mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius. Complejo mosca blanca-geminivirus. Los virus del frijol en Nicaragua. Manejo. Universidad Nacional Agraria. P,1-5.

ROJAS, A.; KVRNHEDEN, A.; y VALKONEN, J. P. T. 2000. Geminivirus infecting tomato crops in Nicaragua. Plant Dis. 84:843-846.

ROJAS, M del R. 2000. Los begomovirus en El Mosaico Dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina en Morales, G.F (ed.). p. 87-90.

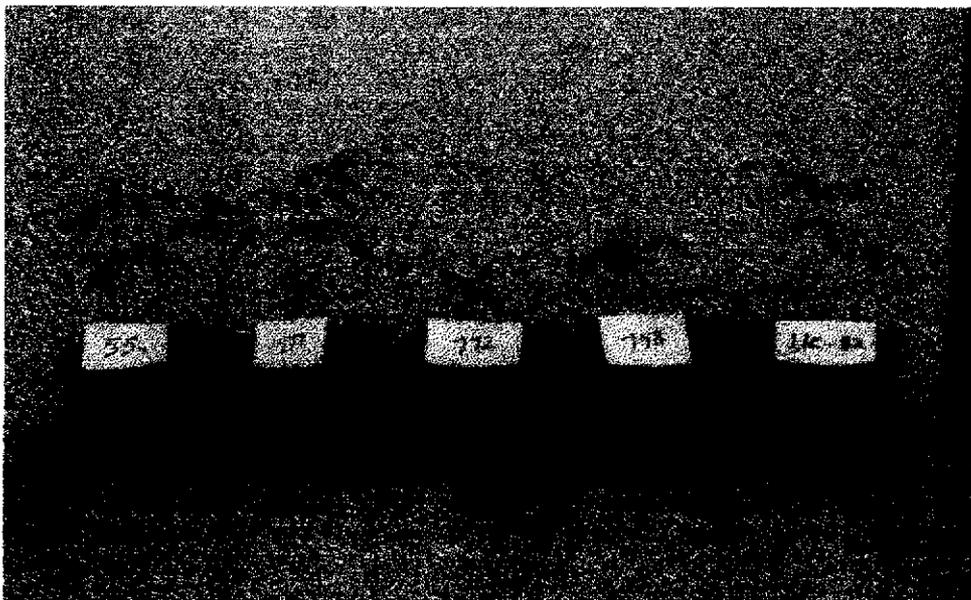
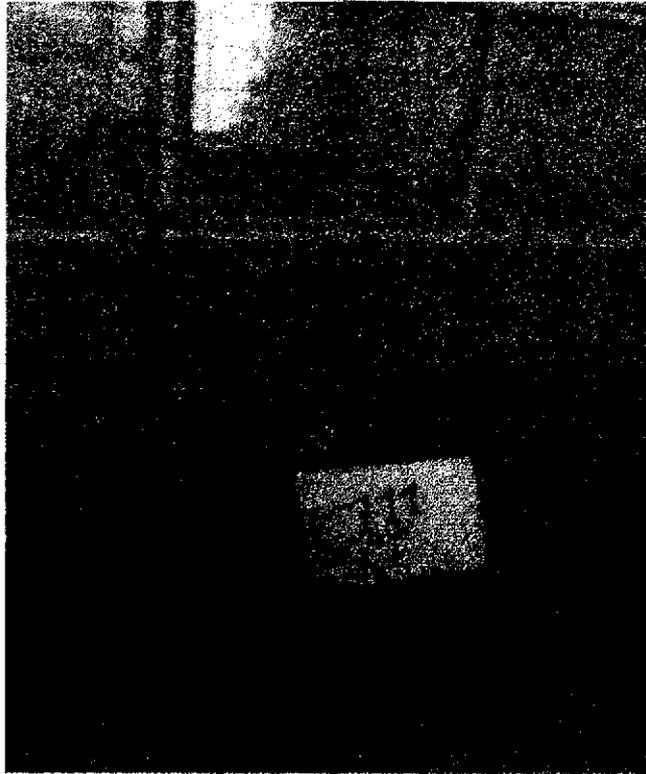
ROJAS, A. 2000. Combate a la mosca blanca del tomate aún persiste. En diario La Prensa. Sección Campo y Agro. Managua, Nicaragua. P. 12B.

SALAS, J. 1993. Biología de la mosca blanca de la batata, *Bemisia tabaci* en Memoria II Taller Latinoamericano y del Caribe sobre moscas blancas y geminivirus. Nicaragua. Resumen. p.60.

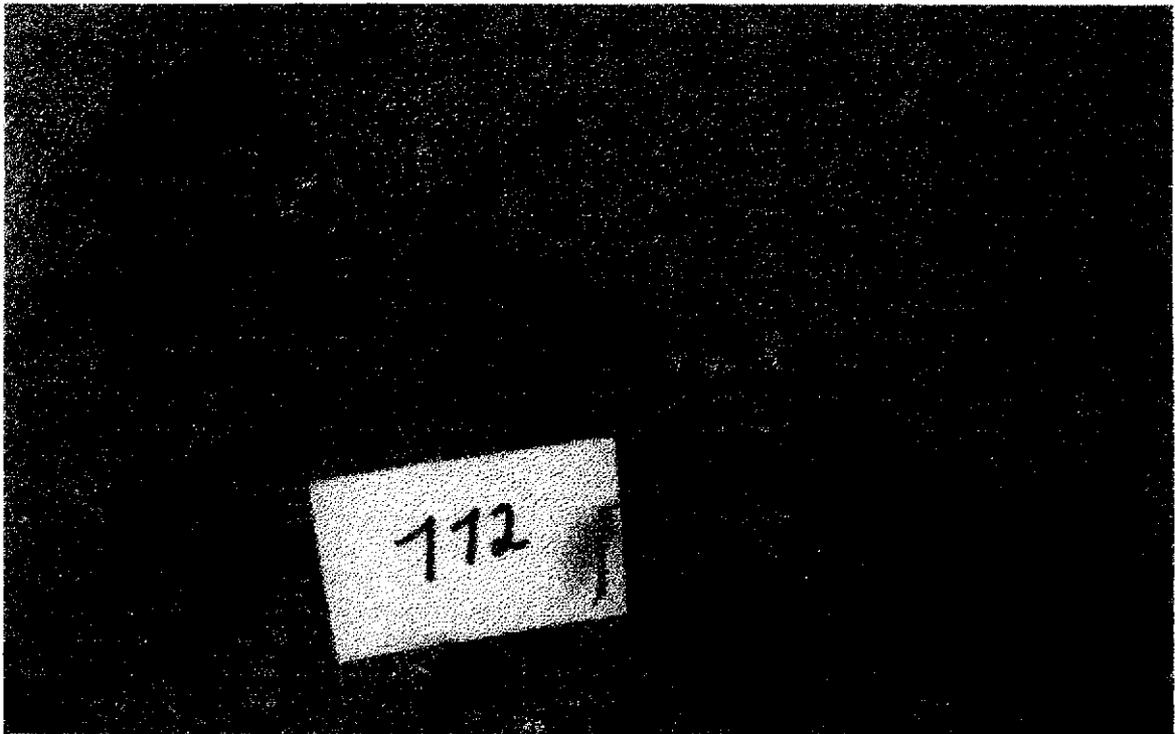
- SALINAS, C. 2002.** Caracterización biológica de un geminivirus transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el valle de Santa Lucía, Boaco. Tesis (Ing. Agr.) Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria. Facultad de agronomía. (datos sin publicar).
- UZCATEGUI, R.; LASTRA, R.; 1978.** Transmission and physical properties of the causal agent of mosaic yellow tomato. American Phytopathological Society 68:985-988.
- VERMA, H.; SRIVASTAVA, K.; MATHUR, A. 1975.** A whitefly-transmitted yellow mosaic virus disease of tomato from India. Plant Disease Reporter 59(6): 134-137.
- WAYNE, W. DANIEL. 1990.** Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. Georgia State University. Limusa. p 339.
- WYATT S. D.; BROWN J. K. 1996.** Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology 86: 1288-1293.
- ZELEDON, K. 2002.** Caracterización biológica de un geminivirus transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el valle de Sébaco. Tesis (Ing. Agr.). Managua, Nicaragua Universidad Nacional Agraria. Facultad de agronomía. (datos sin publicar).

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Materiales de tomate evaluados en fase de invernadero



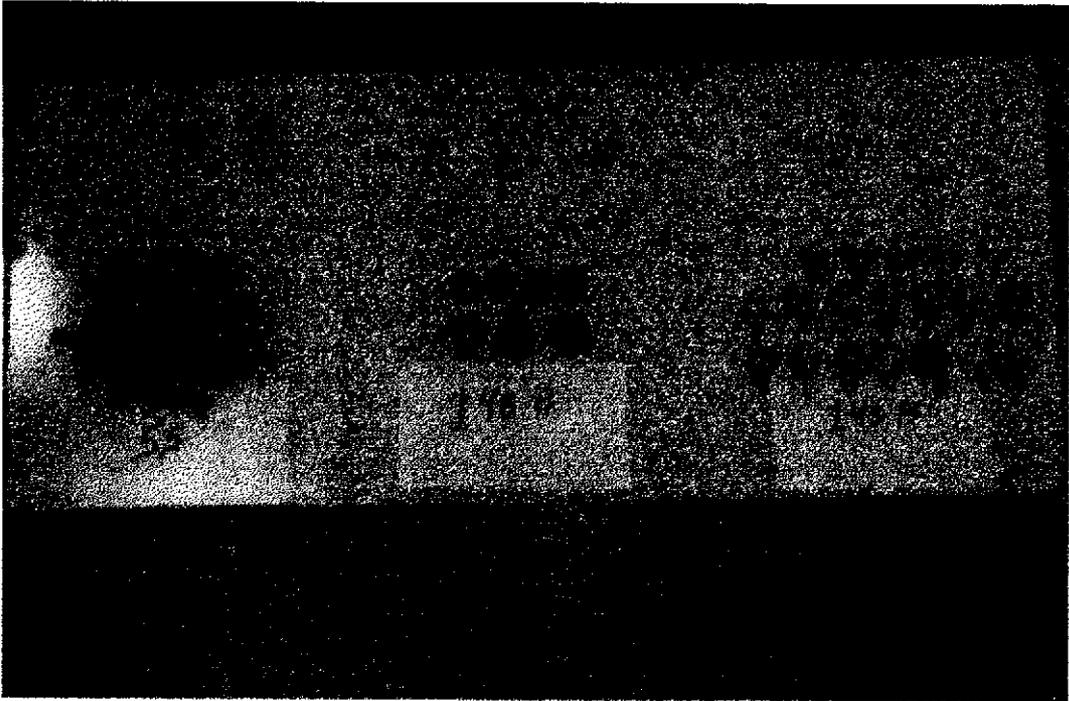
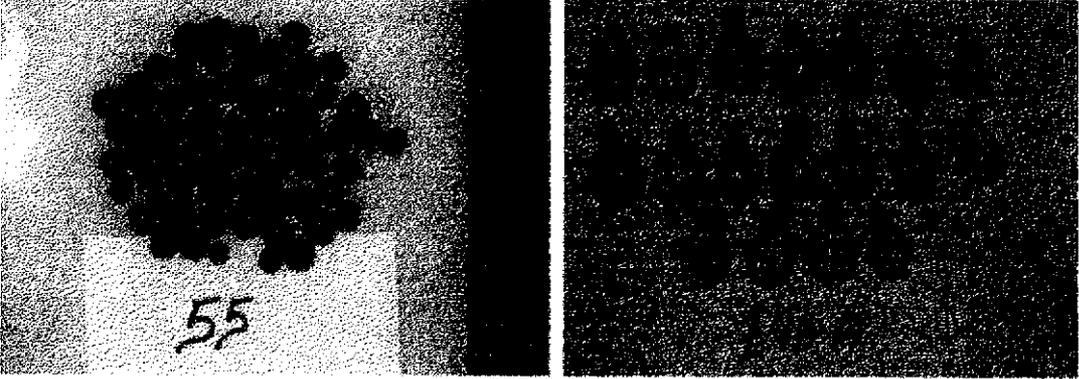
Anexo 2: Material de tomate infectado con geminivirus



Anexo 3: Materiales evaluados en fase fuera de invernadero



Anexo 4: Frutos de tomate silvestres evaluados en la fase fuera de invernadero



Anexo 5: Fuente de inóculo del geminivirus de Condega



Anexo 6: Visualización de bandas de nucleótidos mediante técnica de electroforesis

Fragmento de ADN-A de geminivirus



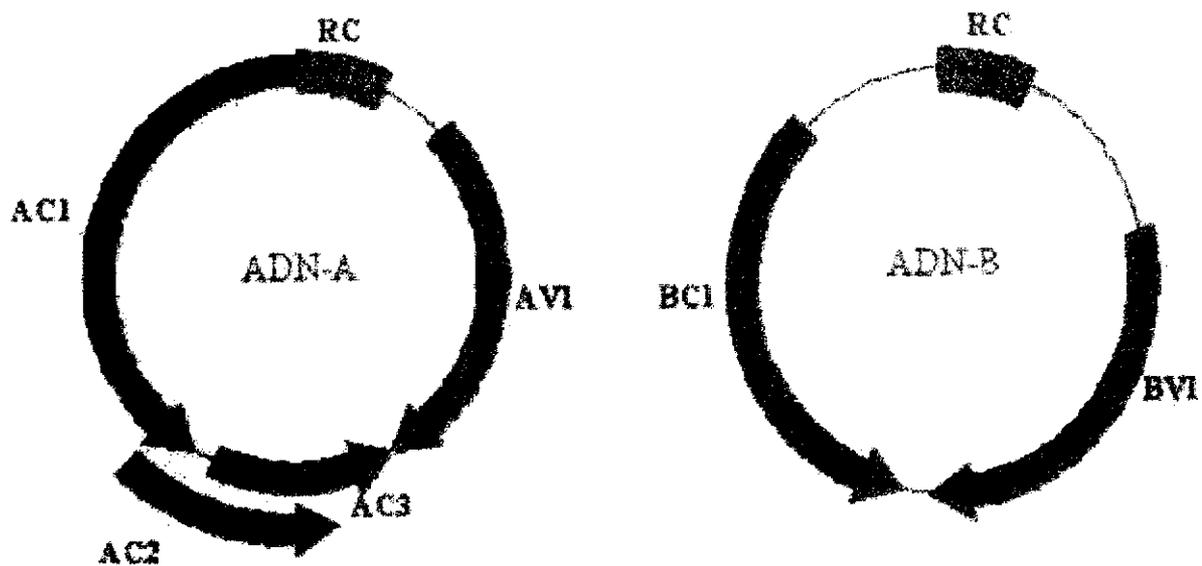
Fragmento de ADN-A de geminivirus



Digestión enzimática de plásmido de ADN
conteniendo inserto de ADN viral.



Anexo 7: Organización típica del genoma de un begomovirus.



Anexo 8: Composición química del fertilizante líquido Completo NPK

Ingrediente activo:	11%
Nitrógeno (N)	13%
Fósforo (P ₂ O ₅)	18%
Potasio (K ₂ O)	
Ingredientes inertes	58%
TOTAL	100%

Contiene quelato orgánico, fitohormonas, antibiótico y ácidos húmicos, posee 420 gramos de ingrediente activo por litro de producto comercial.

Formulado por: PRONEINAGRO, S.A. Guatemala C.A.

Anexo 9: Análisis de varianza para el tratamiento 1 bajo condiciones de invernadero.

F.V	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Fecha	11	3.712	0.337	2.49	0.0055
Material	4	11.771	2.942	21.79	0.0001
Fecha x material	44	0.823	0.018	0.13	1.0000
Error	240	32.432	0.135		
Total	299	48.740			

Separación de Medias según Duncan

FECHAS	MEDIAS	GRUPO
1	11.000	C
2	18.000	BC
3	25.000	ABC
4	25.000	ABC
5	27.000	AB
6	27.000	AB
7	31.000	AB
8	31.000	AB
9	34.000	A
10	35.000	A
11	36.000	A
12	36.000	A
MATERIALES	MEDIAS	GRUPO
1	24.583	B
2	20.833	B
3	56.667	A
4	28.750	B
5	9.167	C

Anexos 10: Análisis de varianza para el tratamiento 2 bajo condiciones de invernadero.

F.V	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Fecha	11	5.128	0.466	5.17	0.0001
Material	4	5.130	1.282	14.24	0.0001
Fecha x material	44	1.515	0.034	0.37	0.9999
Error	240	21.767	0.090		
Total	299	33.542			

Separación de medias según Duncan

FECHA	MEDIAS	GRUPO
1	2.000	C
2	3.000	C
3	11.000	BC
4	11.000	BC
5	15.000	AB
6	16.000	AB
7	16.000	AB
8	18.000	AB
9	21.000	AB
10	25.000	A
11	27.000	A
12	27.000	A
MATERIALES	MEDIAS	GRUPO
1	23.750	A
2	4.583	C
3	26.250	A
4	13.750	B
5	11.667	B

Anexo 11: Análisis de varianza para el tratamiento 3 bajo condiciones de invernadero.

F.V	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Fecha	11	3.826	0.347	2.62	0.0036
Material	4	1.812	0.453	3.43	0.0098
Fecha x material	44	0.567	0.012	0.09	1.0000
Error	240	31.884	0.132		
Total	299	38.090			

Separación de medias según Duncan

FECHA	MEDIAS	GRUPO
1	6.000	B
2	6.000	B
3	15.000	AB
4	16.000	AB
5	16.000	AB
6	17.000	AB
7	19.000	AB
8	23.000	A
9	24.000	A
10	29.000	A
11	30.000	A
12	36.000	A
MATERIALES	MEDIAS	GRUPO
1	24.167	A
2	15.417	B
3	27.083	A
4	14.167	B
5	13.750	B

Anexo 12: Análisis de varianza de la severidad del geminivirus en los materiales evaluados en la fase fuera de invernadero.

F.V	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Fecha	9	8.42	0.93	103.33	0.0001
Material	2	0.46	0.23	25.17	0.001
Fecha x Material	18	0.14	0.007	0.77	0.6029
Error	90	0.83	0.009		
Total	119	9.86			

Separación de medias según Duncan

FECHAS	MEDIAS	GRUPO
1	0.417	H
2	2.500	GH
3	6.250	G
4	12.500	F
5	20.417	E
6	25.833	D
7	32.917	C
8	44.167	B
9	45.833	AB
10	50.833	A
MATERIALES	MEDIAS	GRUPO
1	23.750	B
2	18.750	C
3	29.875	A

Anexo 13: Análisis de varianza para determinar la incidencia del complejo mosca blanca-geminivirus en los materiales evaluados bajo condiciones fuera de invernadero.

F.V	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Fecha	9	40.49	4.49	74.83	0.0001
Material	2	0.30	0.15	2.5	0.1015
Fecha x Material	18	1.25	0.06	1	0.4009
Error	90	5.92	0.06		
Total	119	47.98			

Separación de medias según Duncan

FECHAS	MEDIAS	GRUPO
1	1.667	E
2	10.000	E
3	25.000	D
4	48.333	C
5	76.667	B
6	86.667	AB
7	100.000	A
8	100.000	A
9	100.000	A
10	100.000	A
MATERIALES	MEDIAS	GRUPO
1	63.500	A
2	62.000	A
3	69.000	A

Anexo 14: Análisis de varianza realizado en población de mosca blanca en la fase fuera de invernadero.

F.V	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Fecha	9	0.92	0.10	2.5	0.0140
Material	2	2.24	1.12	28	0.0001
Fecha x Material	18	1.07	0.06	1.5	0.1316
Error	90	3.71	0.04		
Total	119	7.95			

Separación de medias según Duncan

FECHAS	MEDIAS	GRUPO
1	0.417	H
2	2.500	HG
3	6.250	G
4	12.500	F
5	20.415	E
6	25.833	D
7	32.917	C
8	44.167	B
9	45.833	AB
10	50.833	A
MATERIALES	MEDIAS	GRUPO
1	0.951	B
2	0.838	C
3	1.168	A