

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
CATIE  
PROGRAMA DE ENSEÑANZA  
ÁREA DE POSGRADO

Identificación de plantas silvestres  
como reservorios de los virus del mosaico dorado del frijol (BGMV)  
y del mosaico enano del frijol (BDMV), en el Valle de Pueblo Nuevo, Nicaragua.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico de Postgrado y Capacitación  
del Programa de Enseñanza en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales  
del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

*Magister Scientiae*

por

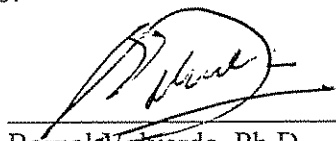
**MARTHA ELIZABETH ZAMORA SOLORZANO**

Turrialba, Costa Rica  
1996

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

*MAGISTER SCIENTIAE*

FIRMANTES:



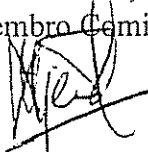
Bernal Valverde, Ph.D.  
Profesor Consejero



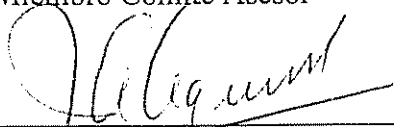
Pamela Anderson, Ph.D.  
Profesor Consejero Auxiliar



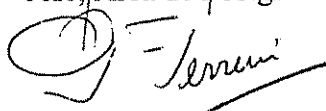
Pilar Ramirez, Ph.D.  
Miembro Comité Asesor



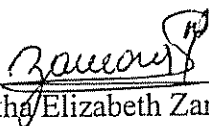
Luko Hilje, Ph.D.  
Miembro Comité Asesor



Juan A. Aguirre, Ph.D.  
Jefe, Area de Postgrado



Pedro Ferreira, Ph.D.  
Director, Programa de Enseñanza



Martha Elizabeth Zamora Solórzano  
Candidato

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Etelvina y Alfonso, y a mi tía Marina quienes me han brindado la oportunidad de ser una profesional, y me han apoyado en todas y cada una de las decisiones de mi vida.

A mi esposo Roger, quien es el pilar que permitió la culminación de este trabajo, su apoyo , cariño y comprensión dieron la fuerza para llegar a la meta.

A mis hijos Erelí Yahosca y Roger Ivan que son la inspiración y la fuerza que han motivado mis deseos de superación.

Al pueblo de Nicaragua, para lograr conjuntamente un mañana mejor.

## AGRADECIMIENTO

A DIOS por estar presente en todos los actos de mi vida.

A todas las personas que de una u otra forma ayudaron a la culminación del presente trabajo, especialmente a las siguientes personas e Instituciones:

Al Dr. Bernal Valverde, profesor consejero por el apoyo en la realización del trabajo, al Dr. Luko Hilje miembro del comité por las sugerencias en la revisión.

Especialmente a la Dra. Pamela Anderson y a la Dra. Pilar Ramírez ambas miembros del comité asesor y sin cuyo apoyo, interés y enseñanzas el trabajo no se hubiera realizado, ambas representan un ejemplo digno de imitar.

A los productores y miembros de la alcaldía de Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua por el apoyo brindado en el trabajo de campo.

A los técnicos del laboratorio del Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica, por el apoyo y amistad brindadas, al programa de caracterización y diagnóstico de virus y viroides en cultivos de importancia económica y alimentari (PCDV), por los análisis realizados.

Al Dr. Douglas Maxwell y al laboratorio de fitopatología de Wisconsin, por los análisis realizados en el laboratorio de Fitopatología.

Al Dr. Alfredo Grijalba director del Herbario Nacional de Nicaragua, por permitir el uso de las colecciones e instalaciones del herbario.

A mis compañeros de la promoción 94-95 por su amistad y experiencias compartidas durante estos dos largos años, especialmente a Lilliana, Aida, Blanca y Francois por su sincera amistad y vivencias compartidas.

Agradezco infinitamente a mi familia por brindarme el apoyo moral necesario para culminar mis estudio.

A la Universidad Nacional Agraria (UNA) de Nicaragua por permitirme el tiempo necesario para realizar los estudios.

Finalmente quiero agradecer a la DAAD (Deutscher Akademischer Austausch Dienst) por brindarme la oportunidad de realizar los estudios de postgrado en el CATIE donde agradezco al personal docente por la formación académica brindada, a la AIC (Agricultural Institute of Canada) por el apoyo financiero en la etapa de campo.

A todos, muchas Gracias.

## TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
TABLA DE CONTENIDOS	vi
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
A. Geminivirus	3
1. Geminivirus del mosaico dorado del frijol (BGMV)	5
2. Geminivirus del mosaico enano del frijol (BDMV)	6
3. El vector: <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	7
a. Biología y Ecología	7
b. Hospedantes	8
c. Biotipos	9
d. Relación virus-vector	10
B. Plantas silvestres en la epidemiología de los virus	12
C. Detección y diagnóstico de los virus	17
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y METODOS	21
A. Etapa de campo	21
1. Descripción de la zona en estudio	21
2. Época del estudio	22
3. Comarcas muestreadas	23

4. Determinación de fuentes de virus	27
5. Recolección de muestras de frijol y malezas	27
6. Identificación de especies de malezas	31
<b>B. Etapa de laboratorio</b>	<b>31</b>
1. Análisis de tejido de frijol (Laboratorio de Fitopatología Universidad de Wisconsin)	32
a. Detección de geminivirus por hibridación molecular en las diferentes comarcas	32
b. Evaluación de sondas específicas	34
2. Análisis de tejido de malezas (CIBCM-Costa Rica)	34
a. Detección de geminivirus por hibridación molecular en las diferentes comarcas	34
3. Caracterización molecular de geminivirus en frijol	39
a. Amplificación de un fragmento de ADN viral por PCR	40
b. Análisis por electroforesis	41
4. Análisis de resultados de laboratorio	41
5. Análisis de datos de campo	42
<b>RESULTADOS</b>	<b>43</b>
<b>A. Etapa de campo</b>	<b>43</b>
1. Determinación de fuentes de virus	43
2. Identificación de malezas y abundancia relativa de las especies encontradas	44
<b>B. Etapa de laboratorio</b>	<b>46</b>
1. Análisis del tejido de frijol	46
a. Síntomas	46
b. Evaluación de las sondas específicas	49
c. Detección e identificación de geminivirus por hibridación molecular en frijol	49

2. Análisis de muestras de malezas	53
a. Síntomas	53
b. Identificación de los geminivirus BGMV y BDMV por hibridación molecular en tejidos de <i>Sida spp</i>	54
3. Presencia del virus según el nivel altitudinal	59
4. Caracterización molecular del geminivirus BGMV en frijol	60
<b>DISCUSION</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>72</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>82</b>



## RESUMEN

El objetivo fundamental de esta investigación fue identificar malezas reservorios de los geminivirus responsables de causar el mosaico dorado del frijol (BGMV) y el mosaico enano del frijol (BDMV), en el Valle de Pueblo Nuevo, zona de alta producción de frijol en Nicaragua.

La investigación se realizó en dos fases: campo y laboratorio. En la fase de campo se realizó un muestreo para establecer si el virus presente en frijol pertenecía a los grupos CULPAD (cultivated plant-adapted viruses) o WILPAD (wild plant-adapted viruses). Se tomaron muestras de tejido de frijol para comprobar la presencia del BGMV y el BDMV, las que fueron analizadas en la Universidad de Wisconsin. Para la identificación de especies se muestrearon seis comarcas del Valle ubicadas en tres niveles de altitud, recolectándose 300 muestras de plantas del género *Sida* (Malvaceae) en cada comarca, ya que plantas de éste género presentaron los síntomas y las características fenológicas de floración o fructificación buscadas, lo que facilitó su identificación. También se recolectó tejido joven de las malezas mencionadas que presentaban síntomas para ser analizadas en laboratorio con la técnica de hibridación de ADN.

Como resultado de la etapa de campo se estableció que en la época de verano no se encuentran áreas con cultivo de frijol en el campo que pudieran funcionar como reservorios para la siembra de primera (mayo-junio), base para ubicar a los virus estudiados dentro del grupo de WILPAD. Los análisis del tejido de frijol comprueban la presencia de los geminivirus BGMV y BDMV en cinco de las seis comarcas muestreadas. En la comarca Los Hatillos no se detectaron geminivirus, sin embargo la presencia de plantas sintomáticas indica la presencia de otro virus.

Las especies de malezas identificadas fueron *S. acuta* y *S. rhombifolia*, distribuidas en las diferentes comarcas muestreadas, predominando la primera especie.

Los análisis del tejido de malezas indican la presencia de un geminivirus relacionado al BDMV en ambas especies; *S. acuta* fue el mayor reservorio en las comarcas muestreadas. Sin embargo, en dos de ellas se detectó la presencia del BGMV en ambas especies, lo que puede deberse a que las sondas utilizadas para el análisis de muestras provenientes de estas comarcas se prepararon con la partícula A del genoma viral, la cual es menos específica.

Los resultados confirman la necesidad de realizar una caracterización molecular de los virus presentes tanto en frijol como en malezas, para lograr una plena identificación de los reservorios de estos virus en Nicaragua y la importancia de especies de *Sida* como reservorio de virus del frijol.

## SUMMARY

The fundamental objective of this research was to identify weeds acting as reservoirs for the geminivirus responsible for causing bean golden mosaic virus (BGMV) and bean dwarf mosaic virus (BDMV), in the Pueblo Nuevo Valley, one of Nicaragua's principal bean-producing areas.

Research was conducted in two phases: field and laboratory. During the field phase, sampling was conducted to establish whether virus present in beans belonged to the CULPAD (cultivated plant-adapted viruses) or WILPAD (wild plant-adapted viruses) group. Bean tissue samples were taken and analyzed at University of Wisconsin to determine the presence of BGMV or BDMV. A total of 300 plant samples of the genus *Sida* (Malvaceae) were collected in each of six zones, from three altitudes in the Valley. Plants of this genus showed desired symptoms and phenological flowering or fruiting characteristics, which facilitated their identification. Young tissue showing symptoms also was collected from those and analyzed in the laboratory by DNA hybridization techniques.

During the dry-season, no bean cultivated areas were found that could have acted as reservoirs for the first planting (May-June), a criteria used to place the viruses studied within the WILPAD group. Analyses of bean tissue corroborated the presence of the BGMV and BDMV geminiviruses in five of the six areas sampled. In the Los Hatillos area, no geminivirus was detected; however, the presence of symptomatic plants indicated the presence of other viruses.

Weed species identified were *S. acuta* and *S. rhombifolia*, distributed in the different areas sampled, with the former species being more predominant.

Analyses of weed tissues indicated the presence of a geminivirus related to BDMV in both species; *S. acuta* was the better reservoir in the areas sampled. Nevertheless, the presence of BGMV was detected in both species in two areas, which can be attributed to the fact that probes used to analyze samples from these zones were prepared with the A particle from the viral genome, which is less specific.

Results confirm the need to conduct a molecular characterization of virus present in beans as well as in weeds to achieve a complete identification of reservoirs of these viruses in Nicaragua and the importance of *Sida* species as bean virus reservoirs.

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de las sondas generales empleadas en el análisis de los extractos vegetales del frijol procedente del Valle de Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua	33
Cuadro 2. Características de las sondas específicas empleadas en el análisis de los extractos vegetales del frijol procedente del Valle de Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua	33
Cuadro 3. Distribución de <i>Sida acuta</i> de acuerdo con el nivel altitudinal, Valle de Pueblo Nuevo, Nicaragua	44
Cuadro 4. Distribución de <i>Sida acuta</i> en las diferentes comarcas del Valle de Pueblo Nuevo, Nicaragua	45
Cuadro 5. Reacción de las sondas general y específica para la detección de geminivirus en pruebas de hibridación con extractos de tejido de frijol en diferentes comarcas del Valle de Pueblo Nuevo, Nicaragua (Lab. de Fitopatología de Universidad de Wisconsin)	51
Cuadro 6. Características de las sondas específicas empleadas en el análisis de los extractos vegetales de las malezas procedentes de Río Abajo, Motolin, La Palagua y El Consuelo, Valled de Pueblo Nuevo, Nicaragua	55
Cuadro 7. Resultados de la hibridación de tejido de malezas recolectadas en las comarcas Río Abajo, y Motolin, Valle de Pueblo Nuevo, Nicaragua	56
Cuadro 8. Resultados de la hibridación de tejido de malezas recolectadas en las comarcas La Palagua y El Consuelo, Valle de Pueblo Nuevo, Nicaragua	57
Cuadro 9. Comparación de la densidad relativa de ADN de las muestras de maleza de los diferentes niveles de altitud en el Valle de Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua.	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Zonas aptas para el cultivo de frijol en Nicaragua (Tapia y Camacho 1988)	25
Figura 2. Mapa del Valle de Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua, indicando las comarcas seleccionadas para el estudio	26
Figura 3. Esquema de las cámaras individuales para preservar el material vegetal	30
Figura 4. Plantas de frijol con síntomas característicos del mosaico dorado (BGMV), en diferentes comarcas del Valle de Pueblo de Nuevo, Estelí, Nicaragua	47
Figura 5. Síntomas presentados por el frijol en la comarca Los Hatillos, Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua	48
Figura 6. Evaluación de la especificidad de las sondas usadas en el análisis del tejido de frijol. 6A. Esquema con ADN control homólogo a las diferentes sondas. 6B-6F autoradiografía con sonda general, sonda BGMV-GAB, sonda BDMV-B, sonda BGMV-BZ-B, y sonda "Bean calico B", respectivamente.	50
Figura 7. Síntomas de virus en las malezas del género <i>Sida</i>	58

## INTRODUCCION

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) pertenece a la familia Fabaceae (Leguminosae) y a la sub familia Papilionoidae. El género *Phaseolus* incluye aproximadamente 200 especies de las cuales 20 son cultivadas para vaina y semilla (Pineda 1983).

El frijol es una de las leguminosas de mayor importancia en América; constituye un alimento básico en la dieta de muchos centroamericanos. En América Latina, representa la fuente más importante de proteínas (15-30 %) y calorías (340 cal/100g), produciéndose en esta región más de 4.000.000 t/año (García, 1988), equivalente al 38% del total de la producción mundial. Brasil es el mayor productor del mundo.

En Nicaragua, el frijol es uno de los granos básicos principales, estimándose el consumo per capita en 50 g/día (Tapia y Camacho 1988; Ministerio de Agricultura 1992). La mayor parte del área destinada al cultivo está en manos de pequeños y medianos productores.

Nicaragua presenta condiciones óptimas para producir frijol, cultivándose desde el nivel del mar hasta los 1500 m.s.n.m., en diferentes regiones del país. Las regiones I (Estelí), IV (Boaco) y VI (Matagalpa) pueden considerarse como las de mayor producción, encontrándose aquí concentradas las mayores áreas para el cultivo.

En Nicaragua, las épocas de siembra están bien marcadas: primera o estación seca (junio 1 a julio 15), postrera o estación lluviosa (setiembre 1 a octubre 15) y apante (noviembre 1 a

diciembre 1). La principal época de siembra es la de postrera; el 25% de la siembra se realiza en áreas pequeñas (0.31 a 2.1 ha) por pequeños y medianos productores (Ministerio de Agricultura 1992).

Los rendimientos promedio de frijol en América Central son muy bajos, de tan solo 600-700 kg/ha; existen sistemas de producción que permiten rendimientos de 1600 Kg/ha, gracias al uso de variedades mejoradas y manejo agronómico adecuado como en los E.E.U.U. (CIAT 1980; Morales 1994). En Nicaragua, en la década de los 80, los rendimientos obtenidos fueron en promedio de 600 kg/ha (Centro de Investigación y Estudio de la Reforma Agraria 1988).

La baja productividad relativa del frijol es consecuencia de problemas bióticos y abióticos. Entre los problemas bióticos, las enfermedades virales transmitidas por insectos juegan un papel importante por su difícil manejo que involucra al cultivo, plantas no cultivadas (reservorios) e insectos (vectores).

Las plantas no cultivadas podrían ser en este caso ser una fuente de inóculo primario. Sin embargo, se desconoce cuáles especies son reservorios y su abundancia en las zonas frijoleras, por lo que es indispensable su identificación para estudios epidemiológicos válidos.

## REVISIÓN DE LITERATURA

Los virus fitopatógenos inducen en sus hospedantes decoloraciones, mosaicos, moteados, manchas foliares y malformaciones; también producen alteraciones en el metabolismo de la célula hospedante (Agrios 1985). Las plantas del género *Phaseolus* son afectadas por varios tipos de virus: sobemovirus (Tremaine y Hamilton 1983) comovirus (Gámez 1982), geminivirus (Goodman y Bird 1978), potyvirus (Morales 1988), de los cuales el grupo de geminivirus, específicamente el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) y el virus del mosaico enano del frijol (BDMV), son importantes, ya que pueden causar serios problemas económicos.

En Nicaragua, varios virus afectan al frijol: los potyvirus conocidos como virus del mosaico común del frijol (BCMV), virus del mosaico amarillo del frijol (BYMV); el sobemovirus, virus del mosaico sureño del frijol (SBMV); el cucumovirus, virus del mosaico del pepino (CMV) y los geminivirus, virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) y virus del mosaico enano del frijol (BDMV), (Rojas *et al.* 1994).

### A. Geminivirus

Los geminivirus causan más de 40 enfermedades en hortalizas y cultivos textiles alrededor del mundo (Costa 1976). Están compuestos por partículas isométricas que se presentan en parejas. Poseen una molécula doble de ADN con un peso molecular de  $0.7-0.9 \times 10^6$

dalton. El ácido nucleico de la mayoría de los virus fitopatógenos está constituido por ARN y éste es uno de los pocos grupos que poseen ADN como ácido nucleico infectivo (Goodman y Bird 1978). Los geminivirus poseen un genoma bipartito constituido por dos moléculas cerradas de ADN, (ADN-A y ADN-B) (Stanley 1985). La infectividad del virus se pierde si se separan las partículas (Lastra 1992; Harrison 1985). El componente A codifica para todas las funciones necesarias para la multiplicación viral y la encapsidación del ADN viral y el componente B codifica para las funciones asociadas para el movimiento del virus (Ramírez y Maxwell 1994). Los geminivirus son transmitidos por insectos del orden Homoptera y se subdividen según el insecto que los transmite. Los geminivirus del subgrupo A son transmitidos por cicadélidos y los del sub-grupo B, por moscas blancas (Morales 1994).

Los geminivirus son molecularmente muy diversos ya que diferentes geminivirus afectan el mismo cultivo en diferentes regiones del mundo. Por ejemplo, existen al menos dos geminivirus diferentes que causan el mosaico dorado en frijol, uno de ellos denominado tipo I, se encuentra en Brasil, el otro, denominado tipo II, en América Central (Ramírez y Maxwell 1994).



## 1. Geminivirus del mosaico dorado del frijol (BGMV)

El BGMV provoca la enfermedad viral más devastadora del frijol; frecuentemente causa pérdidas de hasta el 100% del rendimiento debido a la alta incidencia de abortos florales y al efecto de malformaciones en las vainas (Morales y Niessen 1988).

El mosaico dorado fue informado por primera vez en Brasil en los años 60 por Costa (1965), convirtiéndose años después en una limitante en los países productores del cultivo.

Apareció en la misma década en América Central: en Guatemala en 1970 (Rodríguez 1994), en El Salvador en 1966 (Rivera 1994), en Nicaragua en 1971 (Gámez 1971) y en Honduras en 1985 (Rodríguez *et al.* 1994). En 1980 estaba plenamente establecido en República Dominicana, Haití, Puerto Rico, México e incrementó su incidencia en América Central (Morales 1994).

En Nicaragua, el BGMV se observó por primera vez afectando el cultivo del frijol en la vertiente del Pacífico (Gámez 1971); posteriormente aparecieron plantas con síntomas de la enfermedad en diferentes zonas del país, convirtiéndose en una de las enfermedades virales más importantes en el cultivo (Eslaquit *et al.* 1983; Llano y de Campo 1981; 1988).

En la presente década, técnicos y productores han informado síntomas y pérdidas causadas por el BGMV, en la Región I (Estelí), Región II (San Jacinto y Telica), Región V (Boaco) y Región VI (Matagalpa) abandonándose áreas de cultivo debido a la enfermedad,

como es el caso de la Región II (Anderson *et al.* 1993). En la Región V (Boaco) se informó que el rendimiento disminuyó de 508 kg/ha a 91 kg/ha a causa del BGMV (Anderson *et al.* 1993). Mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de polimerasa) se identificó al BGMV-II en la región de Estelí y Telica (Rojas *et al.* 1994).

## 2. Geminivirus del mosaico enano del frijol (BDMV)

Otra enfermedad viral de importancia es el BDMV. En Argentina, un brote de la enfermedad causó la pérdida total de casi 40,000 ha de frijol entre 1978 y 1981 (Morales *et al.* 1990). El BDMV fue caracterizado por Hidayat *et al.* (1993). En Nicaragua se sospecha la presencia del virus en Santa Lucía, (Boaco), con base en los síntomas observados en el frijol<sup>1</sup>.

Esta enfermedad se conoce como “moteado clorótico del frijol” y como “infección clorótica de las malváceas” (Gámez 1969; Morales *et al.* 1990). Costa (1965), sugiere que es causada por una raza del virus del mosaico del abutilon, transmitido de solo especies de malváceas silvestres, principalmente *Sida spp.* Hidayat *et al.* (1993), indicó que existe una estrecha relación del BDMV y el mosaico del abutilón.

---

<sup>1</sup> MORALES, F. 1992. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. (Comunicación personal)

### 3. El vector: *Bemisia tabaci* (Gennadius)

Los virus, por no tener capacidad de dispersarse y penetrar a la planta por sí mismos, necesitan de diferentes medios de transmisión; la transmisión por insectos vectores es una de las más importantes. Los grupos reconocidos de insectos vectores de virus son los áfidos, crisomélidos, trips, salta hojas y moscas blancas (Lastra 1987).

Se han informado aproximadamente 1.200 especies de moscas blancas, de las cuales solamente tres especies son consideradas vectores: *B. tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* y *T. abutilonea* (Brunt 1986); *B. tabaci* es la más importante y se considera como el vector específico del BGMV y BDMV (Costa 1965).

#### a. Biología y ecología

*B. tabaci* pertenece a la familia Aleyrodidae, orden Homoptera. La duración de su ciclo de vida depende de las condiciones ambientales y el tipo de hospedante (López-Avila 1986). Se puede desarrollar desde los 15 °C hasta los 30 °C; su óptimo está entre los 20 y 30 °C, condiciones bajo las cuales el tiempo generacional se acorta y la fecundidad aumenta, lo que incrementa las poblaciones. El insecto puede producir de 11-15 generaciones por año, tiempo durante el cual las poblaciones permanecen en una sola especie de planta o emigran a una gran variedad de especies vegetales (CIAT 1980).

Posee aparato bucal perforador-chupador y presenta metamorfosis incompleta, pasando por tres estadios: huevo, ninfa y adulto (López-Avila 1986). El primer instar ninfal es móvil, lo que le permite hacer pruebas en el floema de la planta hasta encontrar el lugar más adecuado para alimentarse; los tres instares restantes son sésiles. El cuarto instar es considerado como “pupa” debido a sus cambios morfológicos y de comportamiento (López-Avila 1986). Los adultos tienen una longevidad de 2 a 60 días, se reproducen sexual o partenogenéticamente, iniciando la oviposición durante las primeras 24 horas luego de la emergencia (López-Avila 1986).

Durante la estación lluviosa, las poblaciones del insecto se reducen; posiblemente las lluvias ejercen un efecto mecánico sobre los adultos (Hilje 1995). Se ha informado que las poblaciones alcanzan su pico máximo durante la estación seca (Cock 1986).

Estudios realizados en el Valle de Sébaco, Nicaragua, revelan tres picos poblacionales de *B. tabaci* en el año, en noviembre-diciembre, marzo-abril y agosto-septiembre, los que coinciden con la madurez fisiológica de los hospedantes silvestres, y con las épocas de baja intensidad de lluvia, aumentando el movimiento local de la mosca y la búsqueda de nuevos habitats (Guharay 1994).

## **b. Hospedantes**

*B. tabaci* es cosmopolita y polífaga, las plantas que funcionan como hospedantes del insecto tienen un papel importante en su sobrevivencia; se conocen más de 500 especies

hospedantes de moscas blancas, pertenecientes a 74 familias, la mayoría son plantas silvestres (Greathead 1986; Brown y Bird 1992). Entre ellas se destacan las familias Leguminosae, Compositae, Malvaceae, Solanaceae, Euphorbiaceae, y Convolvulaceae.

En Mesoamérica se ha comprobado que existen hospedantes en 55 especies y 21 familias (Hilje 1995). Se ha observado reproducción, especialmente en algodónero, chile dulce (chiltoma) y melón (Hilje y Arboleda 1993).

En el Valle de Sébaco en Nicaragua, se han detectado 4 especies cultivadas y 21 especies silvestres que funcionan como hospedantes del insecto. La mayoría de estas plantas silvestres son anuales lo que puede crear condiciones favorables para un mayor movimiento del vector dentro de la zona, coincidiendo en este caso con los momentos principales de siembra de los cultivos hortícolas (Guharay 1994).

### **c. Biotipos**

Desde los años 50 se propuso la existencia de biotipos o razas de *B. tabaci*, ya que se presentaban diferencias respecto al ámbito de hospedantes, capacidad de adaptabilidad y capacidad de transmisión de virus (Bird 1957; Bird y Maramorosch 1978). Brown (1993), menciona que existen varias razas de *B. tabaci*, de acuerdo con su distribución geográfica, a los hospedantes que atacan, a características morfológicas y a esterasas marcadoras. En América Central se han reportado los biotipos B, C, D y F (Brown *et al* 1995),

encontrándose los biotipos A y B en los Estados Unidos, México y la Cuenca del Caribe. El biotipo B se caracteriza por tener una mayor fecundidad (Bethke *et al.* 1991), ser más voraz y mayor productor de mielecilla y por presentar un mayor ámbito de hospedantes (Burban *et al.* 1992) y producción de toxinas que inducen en los hospedantes síndromes característicos, como el de hoja plateada, en la calabaza y la maduración irregular en tomate (Cohen *et al.* 1992; Hoelmer *et al.* 1991). Algunos autores con base en estudios biológicos, genéticos y morfológicos han llegado a considerar al biotipo B como una nueva especie, denominándola *Bemisia argentifolii* (Bellows *et al.* 1994).

#### d. Relación virus-vector

En América y en la Cuenca del Caribe se ha identificado a *B. tabaci* como vector de virus, informándose la transmisión de hasta 22 geminivirus en dicha región, por lo que se reconoce como el vector más importante y común de este grupo (Duffus 1987; Harrison 1985; Gerling 1990; Brown y Bird 1992). La Brunt (1986), informa que *B. tabaci* es vector de 19 virus conocidos; Ramírez y Maxwell (1994) reportan 14 geminivirus transmitidos por mosca blanca los cuales han sido clonados y secuenciados. La transmisión de virus por *B. tabaci* se considera persistente-circulativa (Lastra 1987), lo que le permite al insecto ser infectivo durante varios días en forma intermitente. Una característica de este tipo de transmisión es que el período de adquisición es de horas. Lastra (1992) informa que los adultos de *B. tabaci* pueden adquirir el virus de una planta

enferma al alimentarse 4 horas, como es el caso de mosaico amarillo del tomate, y permanecer infectivos hasta por 20 días.

*B. tabaci* es un vector eficiente. Estudios realizados por Gámez (1971), en los cuales inoculó el virus del mosaico dorado a 600 variedades de *Phaseolus*, utilizando a *B. tabaci* como vector, demuestran que insectos individuales son capaces de transmitir el virus y que 10 insectos virulíferos aseguran una infección del 100%, bajo las condiciones del estudio.

La actividad de vuelo de *B. tabaci* esta influida por la edad y calidad del hospedantes; esto provoca el establecimiento de nuevas colonias aumentando la dispersión de los patógenos virales, lo que tiene gran impacto en el manejo del problema (Blackmer y Byrne 1993).

Una vez que selecciona el hospedante, el insecto introduce su estilete en un proceso similar al de los áfidos; el aparato bucal tiene pelos que responden a señales químicas y mecánicas que le permiten seleccionar el hospedante adecuado (Byrne y Bellows 1991). La importancia de este patrón de selección del hospedante radica en que incrementa la probabilidad de diseminación de los virus.

El movimiento local del insecto está determinado por vuelos cortos (5 minutos), en busca de hospedantes en estado vegetativo, dentro del mismo campo (Blackmer y Byrne 1993). El movimiento a largas distancias depende principalmente del viento ya que los adultos no son voladores eficientes (Cock 1986; Byrne y Bellows 1991). El vuelo típico del insecto inicia con una rápida subida en respuesta de la luz, siendo ésta una señal para iniciar vuelos de larga duración bajo condiciones de temperatura y velocidad del viento adecuadas; después

de un período ocurre un aumento del vuelo tanto horizontal como vertical hasta que aterriza sobre un nuevo hospedante (Blacker y Byrne 1993).

Byrne y Bellows (1991), encontraron dos formas dentro de las poblaciones de *B. tabaci*: una forma migratoria y otra que vuela dentro del área en que se establece la población. La primera, considerada una voladora poco hábil aprovecha las masas frías de viento en la mañana para elevarse y trasladarse a otros campos distantes, encontrándose insectos hasta una distancia de 7 km. y a alturas de 150 m.

Las ninfas y adultos producen daños directos e indirectos, los directos se presentan al extraer los nutrimentos y causar alteraciones en el desarrollo de la planta, disminuyendo rendimiento y calidad, como en el caso del algodón en Nicaragua, donde *B. tabaci* causa pérdidas por el manchado de la fibra con fumagina (Comisión Nacional de Mosca Blanca 1992).

Sin embargo, el daño más importante es el indirecto, como vector de patógenos virales los cuales causan serias pérdidas económicas.

## **B. Plantas silvestres en la epidemiología de los virus**

En el manejo de las enfermedades, la epidemiología es una rama clave, ya que es la ciencia que describe las enfermeda-de una población (Vanderplank 1963).



Generalmente, los estudios epidemiológicos comprenden el ciclo del patógeno y la interacción de las poblaciones del patógeno con las poblaciones del hospedante en un ambiente complejo (Griffiths 1978). En el caso de los virus, la epidemiología es complicada puesto que involucra una serie de interacciones: patógeno-planta hospedante, patógeno-vector, planta hospedante-vector y la interacción de todos con el medio ambiente.

En la epidemiología de las enfermedades virales, las plantas silvestres representan una fuente de infección y del vector (Bos 1983).

Thresh (1981), ha considerado tres categorías de malezas y plantas silvestres: a) especies de poca o ninguna importancia epidemiológica, aunque sean los hospedantes originales del virus que ahora prevalecen en cultivos; b) especies que tienen una continua e importante función como hospedantes alternos o perennes de virus que infectan los cultivos y c) especies de crucial importancia como las hospedantes únicas de virus, el cual no se propaga entre plantas cultivadas. También se hace una división de acuerdo con su distribución en los campos cultivados: especies dentro de los campos cultivados, las cuales ejercen una gran presión de infección ya que actúan como focos de virus transmitidos por vectores con poca movilidad y especies alrededor del cultivo se consideran como fuentes potenciales de virus, y especies de áreas lejanas al cultivo.

Harrison (1981), hace referencia a dos grandes grupos de virus dependiendo del tipo de planta que afectan: los que sobreviven en plantas cultivadas incluyendo a los potexvirus,

tobamovirus, ilarvirus y “barley yellow mosaic” y que denomina CULPAD por las siglas en inglés de “cultivated plant-adapted viruses”, y los virus que sobreviven en plantas no cultivadas y cultivadas que incluyen los grupos de tobavirus, nepovirus, luteovirus y geminivirus, denominados WILPAD por las siglas de “wild plant-adapted”.

La infección viral puede originarse dentro del mismo cultivo o puede proceder de otros campos del mismo cultivo desde donde el virus es transportado por vectores. También puede provenir de plantas no cultivadas alrededor de las áreas del cultivo. Las semillas infectadas de plantas no cultivadas pueden permanecer viables en el suelo por años, reteniendo el virus mientras conservan su viabilidad (Bos 1983).

Irwin (1981), enfatiza la necesidad de conocer la ecología de las epidemias así como los factores que afectan su tasa de dispersión, ya que entender las numerosas interacciones entre plantas/patógenos/vectores es importante para su control potencial.

En el caso específico del BGMV y el BDMV, las plantas silvestres pueden representar la fuente primaria del patógeno. Algunos estudios indican que los virus BGMV y BDMV no se transmiten por semilla ni transováricamente en el vector (Costa 1955; Bird 1958; Gámez 1969; Gálvez 1975;). Investigaciones recientes demuestran que ciertos aislamientos de BGMV-II se pueden transmitir mecánicamente a través de savia infectada, al igual que el BDMV (Gilbertson *et al.* 1991).

Desde los años 50 se han realizado estudios en un intento de establecer los reservorios del BGMV y BDMV. Costa (1955), en estudios realizados en Brasil con *B.tabaci* como vector, concluyó que el mosaico de abutilon (AbMV) se distribuye entre especies nativas de *Sida* y otras malváceas, afectando varios tipos de frijol, algodón, okra, soya, lentejas y algunas otras leguminosas.

Bird (1958), realizó estudios en Puerto Rico sobre la amplitud de hospedantes de *B.tabaci* y el virus de la clorosis de *Sida* y otras malváceas (BDMV), inoculando plantas de las familias solanaceae, convolvulaceae, fabaceae, euphorbiaceae, malváceae y otras.

Solamente las malváceas se infectaron del virus, específicamente *Abelmoschus esculentus*, *Sida carpinifolia*, *S. rhombifolia*, *Althaea rosea*, *Gossypium hirsutum* y *Malachra capitata*.

Gámez (1970b), inoculó el BGMV utilizando a *B.tabaci* como vector, para estudiar la reacción de variedades de frijol, especies del género *Phaseolus* y otras leguminosas. De un grupo de 401 variedades de frijol, todas eran susceptibles, manifestando que el ámbito de reservorios incluye variedades de *P. vulgaris* y especies taxonómicamente cercanas a ellas.

Vakili *et al.* (1973) basados en sintomatología dividieron a las plantas silvestres reservorios de virus transmitidos por moscas blancas en tres categorías: especies conocidas y estudiadas, especies estrechamente relacionadas al primer grupo, pero no estudiadas bajo condiciones controladas y especies posibles hospedantes no relacionadas a estos grupos.

Según estos criterios, las familias malváceae y fabaceae (leguminosae) constituyen los mayores reservorios de virus transmitidos por mosca blanca al frijol en América Latina.

En Nicaragua se realizó un trabajo para identificar los hospedantes alternos de mosca blanca y los reservorios de virus, basándose en la oviposición del insecto y en los síntomas externos causados por el virus. Los géneros *Sida* y *Abutilon* fueron hospedantes del insecto y manifestaron síntomas virales (Zamora 1988).

Mejía *et al.* (1994) recolectó malezas en zonas frijoleras de Honduras para determinar si eran hospedantes alternos de BGMV, a través de medios serológicos. Los resultados de este estudio indicaron cuatro especies hospedantes del virus: *Sida acuta*, *Waltheria indica*, *Margaranthus solanacea* e *Hirisanthia cryspa*.

Es necesario identificar los reservorios de BGMV y BDMV en plantas silvestres por métodos alternativos como el uso de métodos moleculares. Conocer el ámbito de hospedantes silvestres es importante para el inicio de estudios epidemiológicos y para entender la permanencia de la enfermedad a través del tiempo.

El género *Sida* podría jugar un papel importante en la epidemiología de estas enfermedades, por lo que es necesario estudiar su diversidad y su papel como reservorio.

Realizar un levantamiento de malezas en las zonas frijoleras es necesario, ya que el diagnóstico de los virus presentes en ellas permitirá la identificación de las especies reservorio de virus.

### C. Detección y diagnóstico de los virus

Originalmente, la identificación de geminivirus se basaba en la sintomatología causada en las plantas afectadas, pero este método no es el más adecuado ya que otros virus pueden provocar síntomas similares a los causados por BGMV o el BDMV.

Actualmente existen técnicas de diagnóstico basadas en la constitución genética del ADN viral, tales como hibridación del ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sambrook *et al* 1989; Ausubel *et al* 1992).

La técnica de hibridación de ADN consiste en fijar a un soporte sólido o membrana los ácidos nucleicos totales de la planta que contienen el ADN viral que se desea analizar.

Posteriormente, este ácido nucleico se hace reaccionar con una sonda que reconoce en forma parcial o total la parte complementaria del genoma viral. La sonda es una secuencia del ácido nucleico viral producido por ingeniería genética, marcado con un isótopo radiactivo o un marcador biológico como la biotina (Salazar y Querci 1992). La reacción se realiza en forma controlada para favorecer la formación del duplex, la sonda marcada hace posible su detección.

Los resultados son positivos cuando en una película de rayos X se visualizan las manchas correspondientes a las muestras, indicación de la presencia del virus cuando se usa la sonda marcada con radioisótopos o quimioluminiscencia (Salazar y Querci 1992; Lastra 1992).

Las membranas con los ácidos nucleicos son hibridizadas en condiciones de baja o alta "astringencia". El término "astringencia" se refiere a las condiciones físico-químicas que permiten la hibridación de ácido nucleico. Las condiciones de baja "astringencia" permiten la hibridación de ADN medianamente relacionados y las condiciones de alta "astringencia" la hibridación de ADN altamente relacionados (Maxwell *et al.* 1994). Esta técnica es empleada para la identificación de virus específicos.

Las sondas utilizadas en hibridación son elaboradas con los componentes A y B del genoma viral. El componente A se usa para elaborar sondas generales para la detección de geminivirus y el componente B para sondas específicas que permiten identificar el tipo de geminivirus.

La técnica PCR permite amplificar regiones específicas del genoma viral, funcionando bajo ciertas condiciones: la utilización de dos iniciadores, uno que marca el inicio y otro el final de la región a amplificar. Se prepara una mezcla conteniendo el ADN de interés, los iniciadores, oligonucleotidos y la enzima TAQ polimerasa que es termoestable. La mezcla se coloca en termociclador donde se dan ciclos de temperatura que permiten la desnaturalización del ADN, el alineamiento de los iniciadores y la síntesis de la secuencia deseada. Los ciclos se repiten 30 veces y en cada uno crece exponencialmente la cantidad

de ADN amplificado, (Sambrook *et al.* 1989). Los fragmentos de ADN viral amplificados se utilizan para conocer la secuencia de nucleótidos de los geminivirus, a través de técnicas de secuenciación. La técnica es usada sobre todo cuando se realiza caracterización de virus.

Las técnicas serológicas se emplean frecuentemente para el diagnóstico de virus. Los geminivirus son difícilmente aislados con un grado de pureza que permita una detección específica a través de anticuerpos policlonales, pero esto se resolvió con la producción de anticuerpos monoclonales que reconocen geminivirus específicos (Morales, 1993).

## OBJETIVOS

- ◆ Verificar la presencia del BGMV tipo II y BDMV en frijol en el Valle de Pueblo Nuevo, Estelí.
- ◆ Identificar el virus que se hospeda en el género *Sida*, en el Valle de Pueblo Nuevo, Estelí, así como identificar las especies de *Sida* que son reservorios del virus
- ◆ Identificar especies de leguminosas reservorios de virus.
- ◆ Comparar la abundancia relativa de los reservorios a diferentes altitudes dentro del Valle.

## HIPOTESIS

- ◆ Algunas plantas silvestres son reservorios del BGMV y del BDMV en el campo.



## MATERIALES Y METODOS

El estudio se llevó a cabo en dos etapas, una de campo y una de laboratorio. La etapa de campo se realizó en Nicaragua, consistiendo en un levantamiento de malezas y recolección de muestras de tejido de frijol y malezas para ser analizadas en una segunda etapa de laboratorio, mediante hibridación de ADN al tejido de frijol y malezas, para detectar e identificar los geminivirus, y una prueba de reacción en cadena de polimerasa para caracterizarlos.

### A. Etapa de campo

#### 1. Descripción de la zona en estudio

El trabajo de campo se realizó en el Valle de Pueblo Nuevo departamento de Estelí (Región I), de la República de Nicaragua (Fig. 1). El valle se localiza al noroeste de Estelí a una latitud de 13°23 norte y una longitud de 86°28 oeste. Su extensión de 222 Km<sup>2</sup>, las altitudes varían entre 500 m.s.n.m. (metros sobre el nivel del mar, piso del valle) y 1730 m.s.n.m. (parte más alta). El Valle de Pueblo Nuevo ha sido tradicionalmente una zona de cultivos de auto-consumo, hortalizas, café y, hasta hace poco tiempo, tabaco. Se siembran 2.050 ha de frijol principalmente en postrera, obteniendo unos 30.000 toneladas anuales destinadas al consumo interno y al comercio. El 70% de la población se dedica al cultivo de granos básicos y el 30% a café, ganado y oficios profesionales (Rivera 1996).

Por sus características climáticas está dividido en tres grandes zonas: zona húmeda con alturas promedio de 1400 m.s.n.m., y pluviosidad promedio de 1200-1250 mm, su producción está basada en café, ganado y granos básicos. Zona semi-húmeda con alturas promedio de 800 m.s.n.m., y una pluviosidad de 900-950 mm, basando su producción en hortalizas, granos básicos y ganado de leche. Zona seca o baja con alturas promedio de 600 m.s.n.m., y una pluviosidad promedio de 800mm en la que se producen granos básicos y se extrae leña.

En el Valle de Pueblo Nuevo, el frijol es afectado de forma endémica por enfermedades de origen aparentemente viral, llegando en 1990 a nivel de epidemia. A partir de entonces, en algunas áreas se inició la siembra de hortalizas como repollo, chiltoma y, principalmente, tomate como alternativa al frijol.

## **2. Época del estudio**

El estudio de campo se realizó entre marzo y junio de 1995, comprendiendo dos meses secos y los de inicio de las lluvias; en los meses secos, cuando el cultivo de interés no estaba en el campo, se procuró determinar las plantas no cultivadas reservorios de virus, es decir, aquellas que sirvan de hospedantes al virus en ausencia del cultivo. Se realizaron tres muestreos en cada área.

### 3. Comarcas muestreadas

El muestreo abarcó seis comarcas de Pueblo Nuevo: El Consuelo, La Palagua, Casa Blanca, Motolín, Río Abajo y Los Hatillos, seleccionadas tomando en cuenta criterios de altitud, presencia y ausencia del virus según los reportes de la Municipalidad y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA (Fig. 2)<sup>2</sup>.

**El Consuelo.** Esta comarca está situada a 1200 m.s.n.m., y se considera como una zona elevada y de clima húmedo. Es una zona cafetalera en un 70% y productora de granos básicos en un 30%; se siembra maíz en primera y frijol en postrera. No ha sido reportada como zona con problemas virales.

**La Palagua.** Esta comarca está ubicada a 1000 m.s.n.m., considerada de altitud elevada y clima húmedo. Es también zona cafetalera y productora de granos básicos, en la que no hay informes de problemas virales.

**Casa Blanca.** Ubicada a 700 m.s.n.m., es una zona de altitud media y clima semi-húmedo donde se producen hortalizas y granos básicos. Ha sido productora tradicional de tabaco y hay informes de problemas de enfermedades virales.

---

<sup>2</sup> INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Managua, Nicaragua.

**Motolín.** Esta comarca está ubicada a 600 m.s.n.m., en una zona de altitud media, con clima semi húmedo, productora de tomate y granos básicos. No hay informes de problemas virales.

**Río Abajo.** La comarca está ubicada a 550 m.s.n.m. (zona baja) tiene clima seco. En ella se producen hortalizas y granos básicos. Además, tradicionalmente se siembra tabaco y se han informado problemas de enfermedades virales.

**Los Hatillos.** Ubicada a 550 m.s.n.m., esta comarca está en una zona baja, de clima seco, dedicada totalmente a la producción de granos básicos, y en la cual se han informado problemas virales.

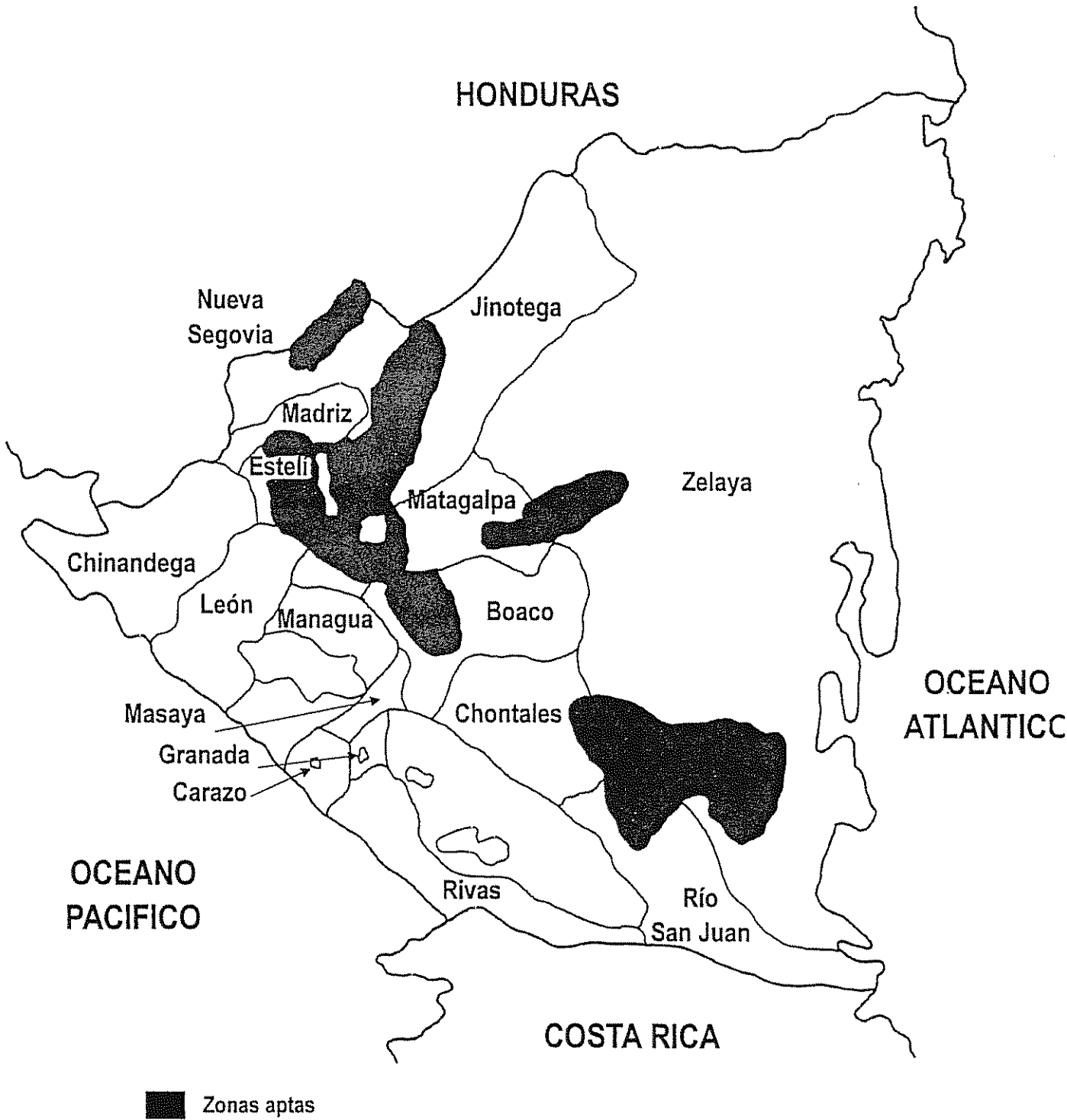


Figura 1. Zonas aptas para el cultivo de frijol en Nicaragua (Tapia y Camacho, 1988)

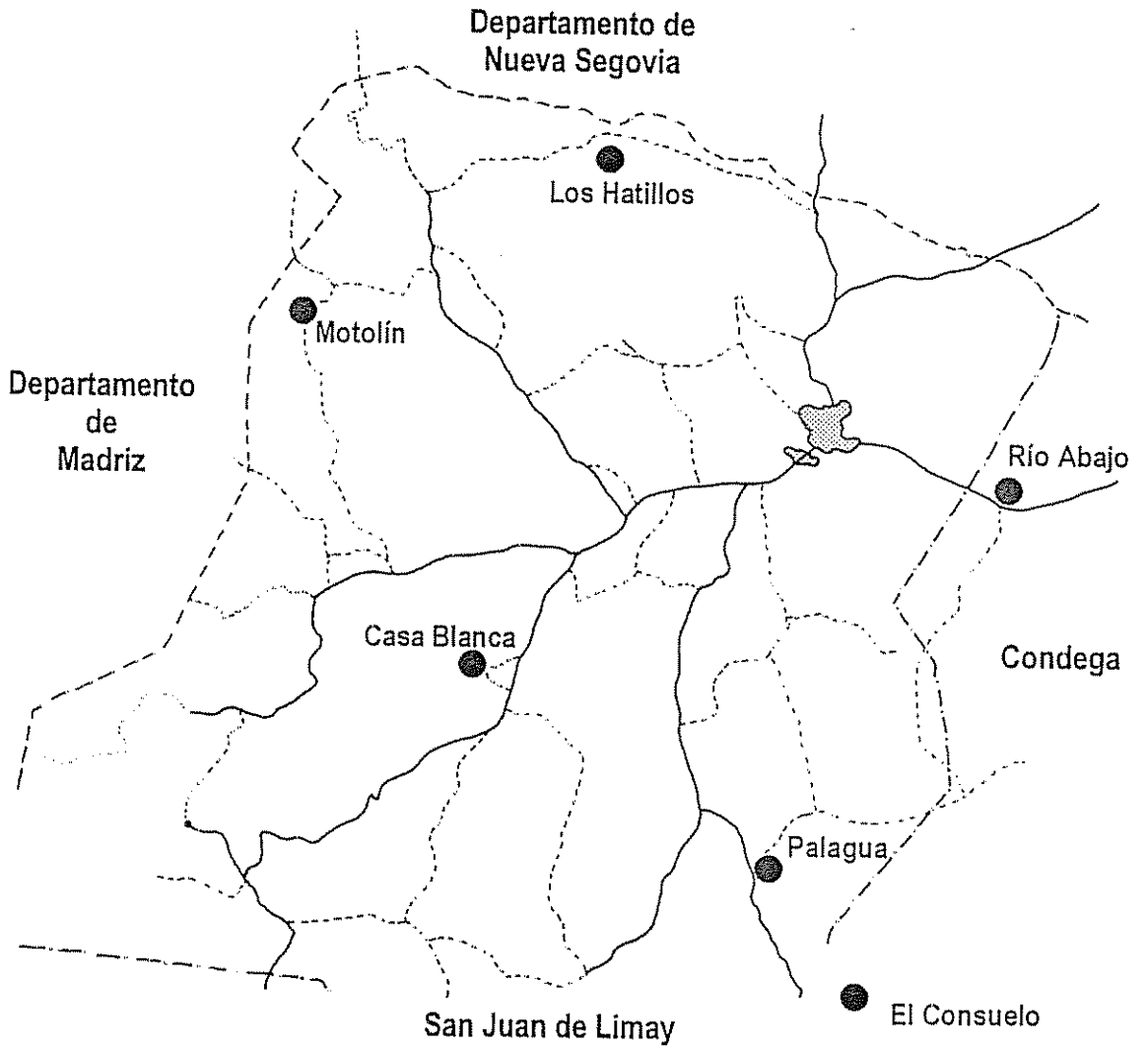


Figura 2. Mapa del Valle de Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua, indicando las comarcas seleccionadas para el estudio.

#### 4. Determinación de fuentes de virus

Con el objetivo de determinar si los virus que afectan al frijol son de tipo CULPAD o WILPAD (Harrison 1981), se realizó un recorrido por el valle de Pueblo Nuevo (incluyendo las comarcas seleccionadas), tratando de ubicar áreas agrícolas sembradas con frijol, donde éste pudiera funcionar como reservorio del virus y fuente para el insecto vector. Esto nos permitiría establecer si el virus proviene del mismo cultivo o de plantas silvestres de los alrededores de las áreas agrícolas.

#### 5. Recolección de muestras de frijol y malezas

Para detectar e identificar los virus en el cultivo se recolectó tejido joven de plantas de frijol en estado de floración. Se tomaron cuatro muestras en cada comarca. La recolección del tejido se realizó a finales de agosto.

El tejido de frijol se preparó en membranas de nylon por el método *squash blot* (Maxwell *et al.* 1994). El método consiste en aplicar y macerar el tejido de la muestra directamente sobre las membranas de nylon para extraer el contenido vegetal, paara esto se tomaron discos de tejido de 4mm de diámetro . Esta técnica se usó en el campo empleando equipo básico de laboratorio (mechero, pinzas, guantes, papel filtro) y material especial (membranas de nylon, pistilo de vidrio). Posteriormente las membranas se enviaron al Departamento de Fitopatología en la Universidad de Wisconsin donde fueron sujetas a un

análisis de hibridación de ADN con el objetivo de identificar el geminivirus presente con la técnica de hibridación radiactiva de ADN, por el Dr. Maxwell.

En el caso de las malezas, el muestreo fue destructivo; se recolectaron plantas sintomáticas y asintomáticas. Las muestras para identificar las especies se recolectaron según las técnicas empleadas por el Missouri Botanical Garden (Liesner 1986), colocando en papel periódico las plantas enteras o partes de ellas con características fenológicas que permitieran su identificación, previo a ser secadas por 48 horas. En cada comarca de estudio se estableció un transecto a partir de un punto preseleccionado al azar, recolectándose las primeras 100 plantas del género *Sida* en estado de floración o de fructificación, para establecer la abundancia relativa de las especies encontradas. El tamaño del transecto fue determinado por la distancia en que se recolectaron las 100 plantas, la cual varió entre 100 y 1000 m.

Para este levantamiento se empleó un método florístico en el cual se identificaron las especies (Kent y Coker 1992), tomándose los siguientes datos:

- a. Recolección de 100 individuos del género *Sida* para obtener posteriormente una frecuencia relativa de las especies.
- b. Cuantificación del número de individuos con síntomas de virosis.
- c. Recolección de tejido de las plantas viróticas.



Las muestras de tejido de malezas destinadas para el análisis viral de laboratorio se recolectaron de la parte apical de las plantas. Posteriormente, se procedió a preparar el material en el laboratorio de Epidemiología de Virus de la Escuela de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional Agraria. El material vegetal se cortó en pequeños trozos los que se almacenaron en frascos de plástico colocados en campanas con Silica Gel durante un mínimo de ocho días. Después de este lapso, las muestras se introdujeron en frascos de vidrio con silica gel, algodón y papel filtro formando cámaras individuales y se sellaron con película de parafina (Fig.3). El muestreo se repitió tres veces en cada comarca, recolectando 300 plantas por comarca. Cuando se observaron plantas silvestres con síntomas de virus durante el muestreo de especies de *Sida*, dichas plantas se recolectaron para su identificación pero no se hicieron análisis en laboratorio para determinar el posible virus causante de los síntomas.

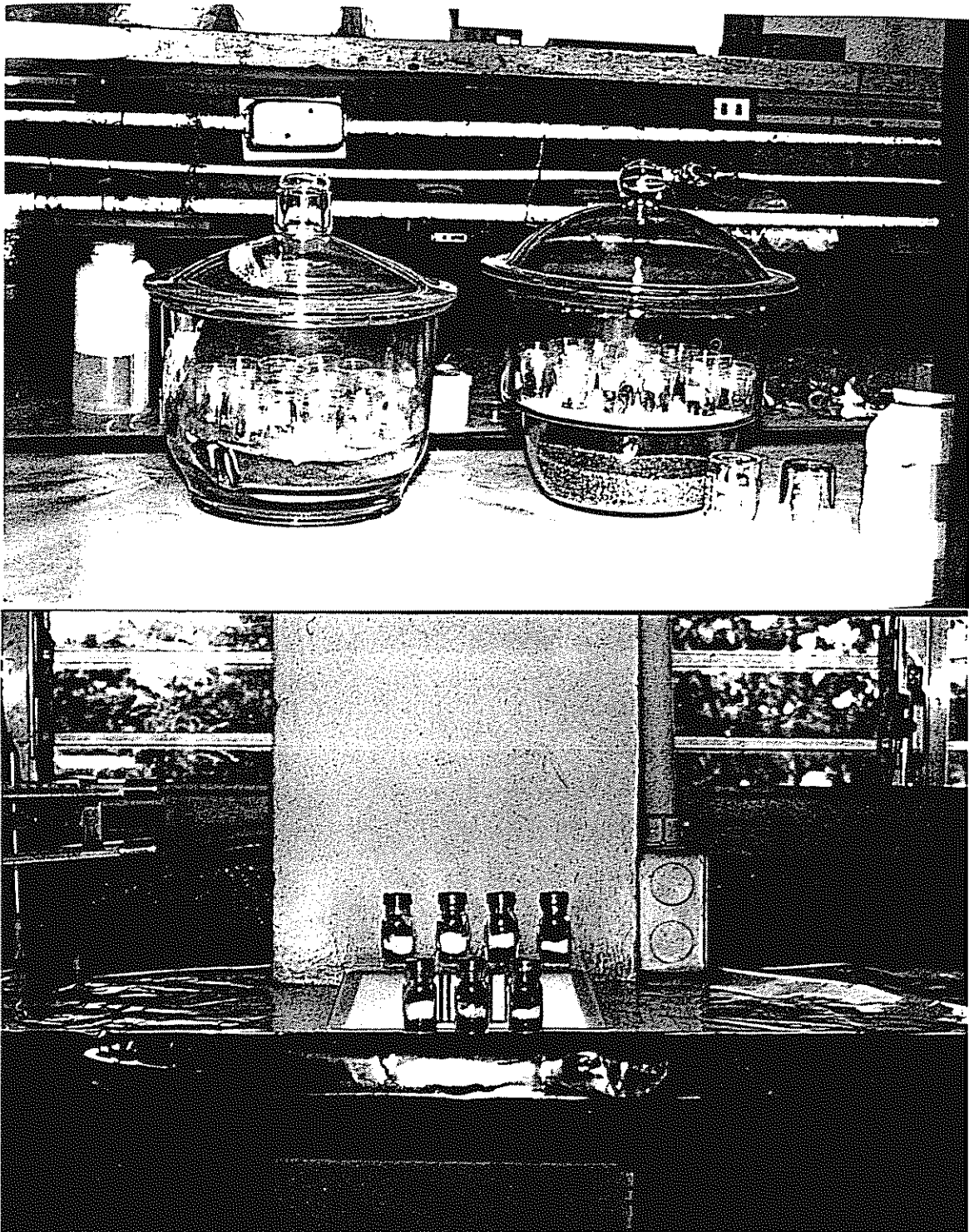


Figura 3. Esquema de las cámaras individuales para preservar el material vegetal.

## 6. Identificación de especies de malezas

Las muestras de malezas recolectadas en el campo se identificaron en el Herbario Nacional de Nicaragua usando claves dicotómicas de la Flora de Nicaragua (Stevens 1995), auxiliada con la Flora de Guatemala (Standley y Steyermark 1949) y la Flora de Panamá (Robyns 1965). También se utilizó como referencia la colección existente en el herbario, la cual está corroborada por expertos del Jardín Botánico de Missouri.

### B. Etapa de laboratorio.

Las técnicas empleadas permitieron la detección e identificación de los geminivirus. La detección consistió en verificar la presencia de un geminivirus en la muestra; la identificación, en determinar el tipo específico de geminivirus.

La detección e identificación de los geminivirus BGMV-II y BDMV en frijol y en malezas, se realizó a través de hibridación de ADN con sondas radiactivas. Estas sondas se usaron a diferentes niveles de astringencia. El término astringencia determina la especificidad de la hibridación molecular (Morales, 1993).

Para la identificación del BGMV y el BDMV en malezas se usaron sondas radiactivas específicas en condiciones de mediana astringencia que hibridiza con secuencias específicas

de geminivirus<sup>3</sup> (Gilbertson *et al.* 1991). Las sondas fueron preparadas y marcadas en el CIBCM en la Universidad de Costa Rica.

## **1. Análisis de tejido de frijol (Laboratorio de Fitopatología Universidad de Wisconsin)**

### **a. Detección de geminivirus por hibridación molecular en las diferentes comarcas**

Los análisis se realizaron en Wisconsin. Para detectar la presencia de geminivirus se usó una sonda general constituida por la suma de sondas ADN-A de diferentes virus: BGMV procedente de los aislamientos de Brasil y Guatemala (BGMV-BZ y BGMV-GA respectivamente), el ADN del moteado del tomate (ToMo) procedente del aislamiento de Florida y el ADN del geminivirus del tomate de Guatemala GA-1 (TGA1-A), (Cuadro 1). Las sondas preparadas en el laboratorio, se linearizaron con enzimas de restricción a diferentes concentraciones y se marcaron con <sup>32</sup>P midiendo en cada caso la cantidad de cuentas por minuto.

---

<sup>3</sup> RAMÍREZ, P. 1995. Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular, UCR, Costa Rica. (Comunicación personal)

**Cuadro 1. Características de las sondas generales empleadas en el análisis de los extractos vegetales del frijol procedente del Valle de Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua.**

Sonda	Componente	Enzimas de restricción	Concentración	CPM
ToMo	A	BglII	* 40 ng/ml	39000000
BGMV-GA	A	SpeI	** 30 ng/ml	20000000
BGMV-BZ	A	HindIII	* 20 ng/ml	27000000
TGA1	A	PstI	** 5 ng/ml	28000000

CPM = Cuentas por minuto

\* Se utilizaron 50ng para preparar la prueba

\*\* Se utilizaron 45ng para preparar la prueba

En la identificación de geminivirus se utilizaron sondas específicas a alta astringencia usando ADN del componente B de los siguientes geminivirus: BGMV-GA y BGMV-BZ, BDMV, del bean calico mosaic (BCMV), (Cuadro. 2).

**Cuadro 2. Características de las sondas específicas empleadas en el análisis de los extractos vegetales de frijol procedente del Valle de Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua.**

Sonda	Componente	Enzimas de restricción	Concentración	CPM
BGMV-GA	B	* HindIII	50 ng/ml	33000000
BGMV-BZ	B	** EcoRI	20 ng/ml	18000000
BDMV	B	* BamHI+PstI	50 ng/ml	29000000
BCaMV	B	** SalI+HincII	10 ng/ml	35000000

CPM = Cuentas por minuto

\* Se utilizaron 50 ng para preparar la prueba.

\*\* Se utilizaron 40 ng para preparar la prueba.

## **b. Evaluación de sondas específicas**

Se evaluó la especificidad de las diferentes sondas específicas que se utilizaron para identificar los geminivirus en frijol. Se prepararon membranas con fragmentos de ADN viral amplificados por PCR, de cada uno de los geminivirus, los cuales funcionaron como controles positivos. Se usó la siguiente simbología: negativo (-) indica no hibridación o sea que no hay virus, positivo débil (+), positivo moderado (++) y positivo fuerte (+++) que corresponde a diferentes concentraciones relativas de geminivirus.

Se hicieron pruebas serológicas en las muestras procedentes de la comarca Los Hatillos, en la cual no se detectó presencia de geminivirus. Estos análisis fueron hechos por técnicos del programa de caracterización y diagnóstico de virus y viroides en cultivos de importancia económica y alimentaria (PCDV), del CIBCM.

## **2. Análisis de tejido de malezas (CIBCM-Costa Rica).**

### **a. Detección de geminivirus por hibridación molecular en las diferentes comarcas**

Las muestras de malezas recolectadas se procesaron en el Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica, utilizando sondas idénticas a las usadas en el laboratorio de Wisconsin con las muestras de frijol.

La técnica de laboratorio se puede dividir en varios pasos: linearización, marcado, precipitación diferencial, cuantificación del ADN sonda, extracción del ADN de la muestra, preparación de membrana, prehibridación e hibridación de membranas y revelado de la hibridación (Anexo 1) (Sambrook *et al.* 1989; Ausubel *et al.* 1992).

Se realizó una prueba con las muestras de El Consuelo para valorar la metodología de preparación de membranas. La colocación de muestras en la membrana se realizó a través de filtración al vacío con equipo especial: un "Dot Blot" en el que se colocaron 50  $\mu$ l de extracto vegetal, que para ser absorbidos requirieron aproximadamente 90 minutos, lo que dificulta el proceso. Las otras membranas se prepararon usando micropipetas con 5  $\mu$ l de extracto vegetal.

Los pasos para la preparación de la sonda fueron los siguientes:

#### Linearización del ADN-sonda

Las moléculas de ADN viral del BGMV-GA-B y BDMV-B que se utilizan como sonda están insertadas en plásmidos bacterianos por lo que se realiza un proceso de digestión y linearización con las enzimas de restricción, Hind III y BamHI + PsT1. Posteriormente se procedió a limpiar y a cuantificar el ADN. Para el proceso de limpieza se tomaron 20  $\mu$ l de cada uno de los plásmidos a los que se adicionaron 280  $\mu$ l de la solución amortiguadora TE 1x estéril (10 mM Tris HCl pH 8 + 1mM EDTA pH 8). Para desproteinizarlo se agregaron 300  $\mu$ l de PCI (Fenol-Cloroformo-Isoamil) centrifugándolo por 10 minutos. Al

sobrenadante se le agregó un décimo del volumen de NaOAc 3M, pH 5 y 2.5 volúmenes de etanol (EtOH) para precipitar el ADN y se mantuvo a 80° por una hora en baño maría. Posteriormente se lavó con 1ml de etanol al 70%, se liofilizó y se resuspendió en 100  $\mu$ l de TE 1x estéril. La cuantificación del ADN se realizó con un fluorómetro (Hoefer Scientific Instruments modelo TKO 100).

### **Marcado de la sonda**

El ADN limpio se utilizó como sonda y se marcó con iniciadores al azar (secuencia de hexonucleótidos) para iniciar la síntesis de la cadena complementaria de ADN, el nucleótido marcado con  $^{32}\text{P}$  fue dCTP. El procedimiento para el marcaje fue el siguiente: al ADN se le agregaron 10  $\mu$ l de buffer de marcaje, 5  $\mu$ l de la solución conteniendo los iniciadores, 10  $\mu$ l de dCTP marcado con  $^{32}\text{P}$ , 2  $\mu$ l de enzima Klenow polimerasa, la cual polimeriza una molécula de ADN complementaria al patrón, y 7  $\mu$ l de agua para completar un volumen de 50  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 37° durante seis horas y posteriormente se realizó la precipitación diferencial.

### **Precipitación diferencial del ADN-sonda**

El ADN sintetizado por medio de la enzima Klenow se precipitó y se eliminaron los nucleótidos no incorporados en la cadena complementaria. Para ello se agregaron 2 ml de



“Carrier” (moléculas de ADN no específica que ayudan a precipitar), un volumen de acetato de amonio 4M pH 5, 300  $\mu$ l de etanol y se dejó precipitar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El tubo con la solución se colocó a  $37^{\circ}\text{C}$  por dos minutos con el objetivo de redissolver los nucleótidos libres que precipitaron en el paso anterior, se centrifugó 15 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante se eliminó. El pellet de ADN se lavó con 500  $\mu$ l de acetato de amonio pH 4.8 más etanol al 70%. Se dejó secando toda la noche.

### **Cuantificación de radiactividad incorporada al ADN-sonda**

La radiactividad incorporada en la reacción se midió a través de precipitación de ADN con TCA (ácido tricloracético). Se depositaron 5  $\mu$ l de cada sonda sobre diferentes trozos de papel de fibra de vidrio de 2 cm de diámetro por duplicado. Una copia se colocó en tubos con la solución de centelleo omnifluor y se midió la radiactividad incorporada. La otra copia se sumergió en TCA 5% hirviendo, durante 5 minutos y luego en etanol 95% por 5 minutos; se dejaron secar y se introdujeron en tubos con 10 ml de omnifluor. La radiactividad presente se determinó en un contador de radiactividad marca Beckman, modelo LS 6000SC.

### **Extracción de la muestra y preparación de la membrana**

El objetivo de este paso es extraer el ácido nucleico total, las proteínas y preparar la membrana inmovilizando así las macromoléculas sobre un soporte sólido mediante

temperatura. El material vegetal se colocó en tubos Eppendorf y luego en nitrógeno líquido para facilitar la maceración. A cada tubo se le agregaron entre 500 y 1000  $\mu\text{l}$  de buffer de extracción STE 1X (0.1M NaCl, 10 mM Tris Cl<sub>2</sub> pH 8, 1mM EDTA), para obtener el extracto crudo; luego se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos pasando el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio. Esta operación se repitió hasta lograr una solución limpia; posteriormente se aplicaron 5  $\mu\text{l}$  de esta solución a la membrana de nylon y se incubó a 80°C por 30 minutos para inmovilizar el ADN.

### **Prehibridación e Hibridación de la membrana**

En esta etapa se satura la membrana con ADN no viral para que la sonda marcada que reconoce los geminivirus hibridice solamente con el ADN viral presente en la muestra. Para la prehibridación se empleó la solución amortiguadora 6x SSC (1x SSC = Citrato de sodio) 0.5x Blotto (5% de leche en polvo descremada (Dos Pinos, marca local), disuelta en agua conteniendo 0.02% de ácido sódico), 1% NP<sub>40</sub> (detergente). Esta solución se pasó por filtros Milipore (0.45 micrones) y se le agregó espermatozoides de salmón fragmentado y desnaturalizado a una concentración de 100 ng/ml de ADN. Se usaron 0.2 ml por cm<sup>2</sup> de membrana. Posteriormente se procedió a incubar la membrana a 68<sup>o</sup> por una hora.

Las membranas se colocaron en los tubos para hibridación y se les agregó el buffer de hibridación conteniendo la sonda radiactiva previamente desnaturalizada y se dejó en reposo toda la noche a 68°C. Posteriormente se realizaron los lavados de post hibridación

que determinan la astringencia de la reacción (mediana). Se eliminó la sonda marcada y posteriormente se realizaron dos lavados con buffer conteniendo 2X SSC 0.1% y SDS a temperatura ambiente por 10 minutos. Se realizó un tercer lavado con buffer 2X SSC 0.1% a 42°C por 30 minutos. Para mediana astringencia se lavó por 30 minutos con 1X SSC, 0.1% SDS a 68°C. Las membranas se envolvieron posteriormente en "saran wrap".

### **Revelado de la hibridación**

El  $^{32}\text{P}$  emite partículas  $\beta$  con suficiente energía para penetrar agua, plástico o pasar una película de rayos X. En un cuarto oscuro se colocó una película de rayos X sobre las membranas forradas en "saran wrap" y se incubaron a -70 °C al menos por 24 horas. Las partículas  $\beta$  se imprimen sobre la película, la cual se revela mediante proceso fotográfico.

A través de un programa de computadora se calculó la intensidad de la marca impresa en la película para hacer comparaciones de concentración relativa de ADN.

### **3. Caracterización molecular de geminivirus en frijol**

Esta prueba se hizo con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en frijol a través de la hibridación. Consiste en amplificar específicamente fragmentos de ADN viral y compararlos con los de virus conocidos. Para obtener el ADN relativamente puro (ADN de la planta y ADN viral) se utilizó el protocolo de Dellaporta. Se colocaron 0.05 g de tejido vegetal en tubos Eppendorf y en nitrógeno líquido para facilitar su pulverización, se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de buffer de extracción. Se adicionaron 33  $\mu\text{l}$  de SDS (detergente) al 20% incubando a 65° por 10 minutos, 160  $\mu\text{l}$  de acetato de potasio 5M (KoAc)

agitándose por 5 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm, con el objetivo de precipitar las proteínas.

El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se le agregaron 500  $\mu$ l de fenol-cloroformo-isoamilo (PCI), se agitó y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 5 minutos para eliminar las proteínas que permanecen en la interfase. Al sobrenadante que contiene los ácidos nucleicos se le agregaron 225  $\mu$ l de isopropanol para precipitar el ADN, se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol al 70% a  $-4^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. Se liofilizó hasta eliminar el etanol, en un liofilizador Labconco serie 226716. El precipitado se resuspendió en agua y puede ser conservado a  $-20^{\circ}$  por tiempo indefinido.

#### **a. Amplificación de un fragmento de ADN viral por PCR**

Se amplificó un segmento de ADN viral con la utilización de iniciadores conocidos, nucleótidos, la enzima TAQ polimerasa, magnesio, y solución amortiguadora. La solución obtenida por el procedimiento de Dellaporta se resuspendió en agua estéril, haciendo posteriormente una dilución de la muestra 1 en 10 (1  $\mu$ l de muestra más 9  $\mu$ l de agua).

Aparte se preparó una mezcla de reactivos que permitiera una eficiente amplificación del ADN viral. Se mezclaron 4  $\mu$ l de dNTPs (nucleótidos), 4  $\mu$ l de  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu$ l de buffer libre de magnesio, 1  $\mu$ l de TAQ (enzima polimerasa termoresistente), 1  $\mu$ l de cada uno de los iniciadores usados y 34  $\mu$ l de agua de PCR para un volumen final de 50  $\mu$ l de reacción.

Esta reacción se colocó en un termociclador marca Perkin Elmer Cetus, programándose

para 30 ciclos con temperaturas de 94°C, 55°C y 72°C con tiempo de 1, 2 y 3 minutos, respectivamente.

#### **b. Análisis por electroforesis**

Los productos del PCR se colocaron en geles de agarosa al 1% más un buffer TBE 0.5x. (Tris base, ácido bórico, EDTA pH8) para separar los segmentos por tamaño mediante electroforesis. El ADN cargado negativamente migra hacia el polo positivo cuando se expone a un campo eléctrico. Se aplicó una corriente de 170 ó 200 volts por 30 minutos, permitiendo la separación del ADN de menor peso molecular. El gel de agarosa se colocó en una solución de bromuro de etilo donde se visualizaron las bandas de ADN a través de la luz ultravioleta del transluminizador marca Fotodyne. Los resultados fueron impresos en película fotográfica.

#### **4. Análisis de resultados de laboratorio**

Las películas fotográficas conteniendo las impresiones de las membranas hibridizadas de frijol se valoraron visualmente, asignándoseles símbolos + o - para indicar la presencia o ausencia de geminivirus. En el caso de las malezas se computarizaron las marcas reveladas en la película, lo que representó la densidad relativa de ADN y se compararon con los valores del control negativo.

## 5. Análisis de datos de campo

Para detectar diferencias en la abundancia de las especies entre los niveles de altitud y entre las comarcas de cada nivel, se hizo análisis de varianza y comparación de medias. También se realizó análisis de varianza entre las concentraciones relativas de ADN en las muestras de malezas que resultaron positivas, para compara entre los niveles de altitud.

## RESULTADOS

### A. ETAPA DE CAMPO

#### 1. Determinación de fuentes de virus

En el muestreo realizado en marzo de 1995 en el Valle de Pueblo Nuevo incluyendo las comarca seleccionadas (El Consuelo, La Palagua, Motolin, Casa Blanca, Río Abajo y Los Hatillos), no se encontraron áreas sembradas de frijol, ni rastrojos del cultivo que pudieran funcionar como reservorios de virus.

En la zona húmeda, los productores se dedican al cultivo de café y al ganado por lo que no siembran granos básicos durante este período correspondiente a la estación seca (febrero-mayo). El ganado invade las áreas de cultivo en verano, eliminando así los residuos de cosecha y con ello la posibilidad de que permanezcan reservorios del mismo cultivo.

En la zona semi-húmeda, los productores se dedican al cuidado del ganado y a la siembra de hortalizas como el repollo (*Brassica oleracea*), chiltoma (*Capsicum spp* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) por lo que tampoco siembran frijol durante la estación seca.

Los productores de las áreas secas no siembran durante ésta estación ya que la carencia de riego lo imposibilita, dedicándose a la recolección de leña como medio de subsistencia.

## 2. Identificación de malezas y abundancia relativa de las especies encontradas

En un muestreo previo se observó una alta abundancia del género *Sida* de la familia de las malváceas. Se observaron muchas plantas con síntomas similares a los causados por el virus del mosaico dorado en frijol, sin embargo estos síntomas no fueron observados en otras especies. Por lo tanto, el estudio se concentró en la recolección de malezas del género *Sida* y el cálculo de su abundancia relativa, puesto que fue la maleza que presentó los síntomas buscados y el estado fenológico adecuado según los objetivos del estudio. Las especies identificadas fueron *Sida acuta* Burman.f y *Sida rhombifolia* L.

El nivel altitudinal no determinó la distribución de *Sida*; sin embargo, *S. acuta*, la especie dominante, apareció principalmente en las áreas más bajas (550 m.s.n.m.) (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Distribución de *Sida acuta* de acuerdo con el nivel altitudinal, Valle de Pueblo Nuevo, Nicaragua.**

Altitud (msnm)	Proporción de <i>S. acuta</i> (%)	Coef. de variación (%)
< 500	82.8	17.8
600-700	80.3	40.8
> 1000	89.2	14.2



El análisis de la distribución de las especies dentro de cada una de las comarcas estudiadas, muestra un dominio de *S. acuta*, siendo su abundancia mayor en la comarca Motolín y menor en Casa Blanca, ambas del nivel medio (Cuadro 4), mientras que *S. rhombifolia* presentó una distribución complementaria (opuesta).

**Cuadro 4. Distribución de *Sida acuta* en las diferentes comarcas del Valle de Pueblo Nuevo, Nicaragua**

Comarca	Proporción de <i>S. acuta</i> (%)	Coef. de variación (%)
Río Abajo	91.3	16.4
Los Hatillos	74.3	13.5
Casa Blanca	61.0	64.9
Motolín	99.7	0.6
El Consuelo	81.0	17.1
La Palagua	97.3	3.1

Se realizó una búsqueda de otras malezas que presentaran síntomas similares. Se encontraron *Croton sp*, *Cleome spinosa*, *Walteria indica*, *Boheravia erecta*, *Cajanus cajan* y *Crotolaria sp*, las cuales se presentaron esporádicamente, razón por la cual no fueron cuantificadas ni se recolectó tejido. *Boheravia erecta* se ha encontrado como reservorio de geminivirus en otras zonas del país<sup>4</sup>.

<sup>4</sup> MAXWELL, D. 1995. Laboratotio de Fitopatología Universidad de Wisconsin.E.U. (Comunicación personal)

## **B. ETAPA DE LABORATORIO**

### **1. Análisis del tejido de frijol**

#### **a. Síntomas**

En El Consuelo, La Palagua, Motolin, Casa Blanca y Río Abajo, las plantas infectadas presentaron dos tipos de síntomas. El primer tipo de síntoma se manifestó como amarillamiento foliar intenso en forma de mosaico, contrastando entre áreas verdes y amarillas, pero las plantas tenían apariencia vigorosa, mientras que el segundo tipo manifestó acortamiento de los entrenudos, malformación en las hojas y enanismo (Fig. 4).

No se observó un patrón específico de distribución de las plantas enfermas, más bien pareció ser al azar dentro de las áreas afectadas, estimándose visualmente un 10% de plantas sintomáticas.

En la comarca Los Hatillos, la sintomatología del frijol fue diferente y consistió de mosaico y rugosidad en las hojas en forma de ampollado, dando la apariencia de anormalidad y enanismo. La distribución fue uniforme estimándose un 100% de plantas poco vigorosas y con síntomas (Fig. 5). Basados en la sintomatología y distribución se realizó un análisis serológico para el mosaico rugoso (comovirus) y para el grupo de potyvirus (mosaico común), detectándose la presencia de un potyvirus.



Figura 4. Plantas de frijol con síntomas característicos del mosaico dorado (BGMV), en diferentes comarcas del Valle de Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua.

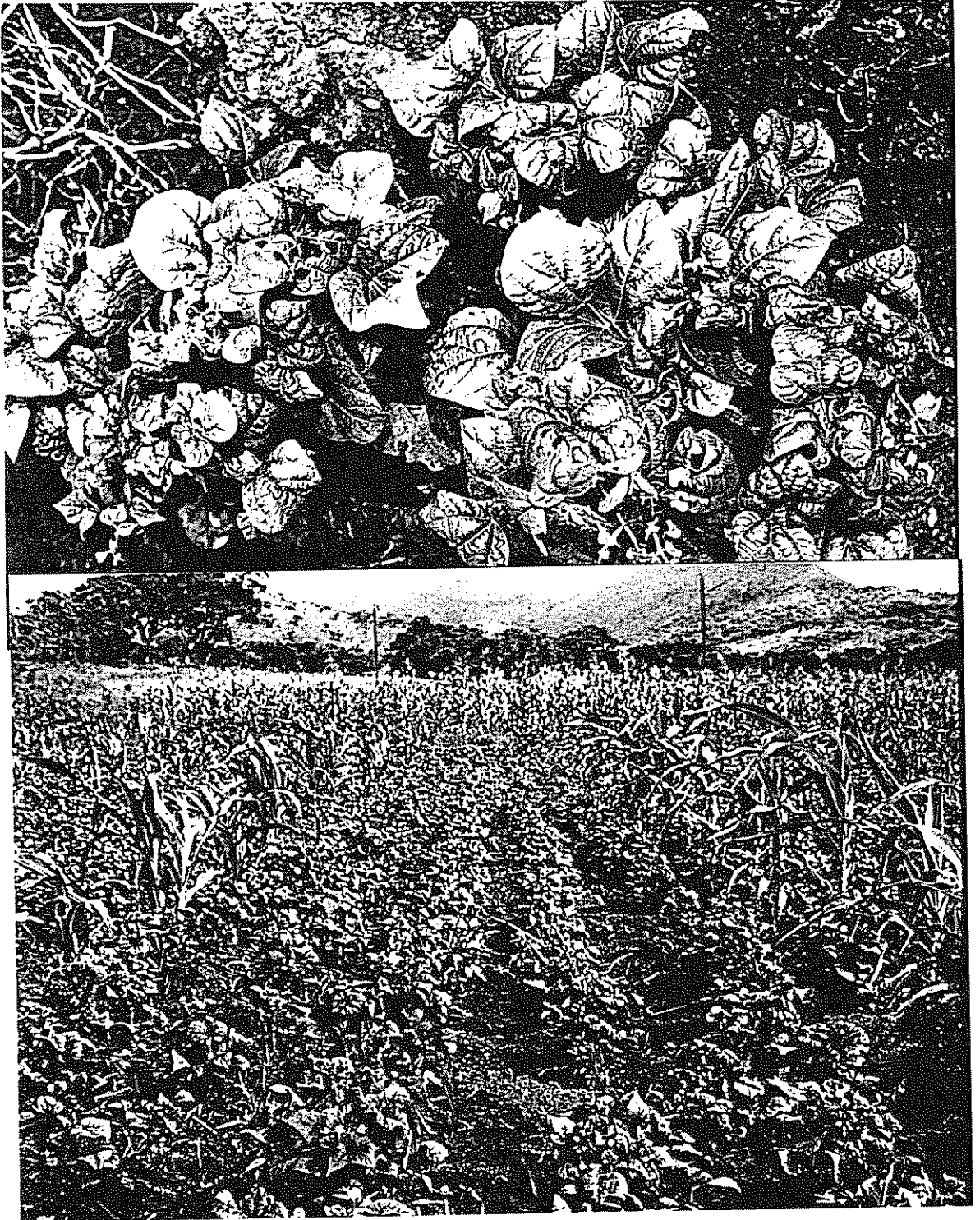


Figura 5. Síntomas presentados por el frijol en la comarca Los Hatillos, Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua.

### **b. Evaluación de las sondas específicas**

Las sondas virales específicas de los geminivirus utilizados en este trabajo, reaccionaron con el ADN homólogo en cada caso. No se observó reacción inespecífica con el resto de ADN colocado en la membrana (Fig.6). Así se comprobó la especificidad de la sonda.

### **c. Detección e identificación de geminivirus por hibridación molecular en frijol.**

El 46% de los extractos de frijol de las diferentes comarcas analizadas reaccionaron en mayor o menor grado con la sonda general, detectando la presencia de algún tipo de geminivirus en las muestras (Cuadro 5).

En cuanto a la identificación con las diferentes sondas, algunos de los extractos reaccionaron positivamente con las sondas específicas para BGMV-GA-B, BGMV-BZ-B, BDMV-B y débilmente con el BCaMV-B. En el caso de la sonda BGMV-GA-B, el 25% de las muestras presentó una reacción positiva fuerte, el 4.16% una reacción positiva moderada, un 4.16% una reacción positiva débil, un 66.6% presentó una reacción negativa (Cuadro 5).

Solo el 17% de las muestras reaccionó (positivo moderado o débil) con la sonda BGMV-BZ-B.

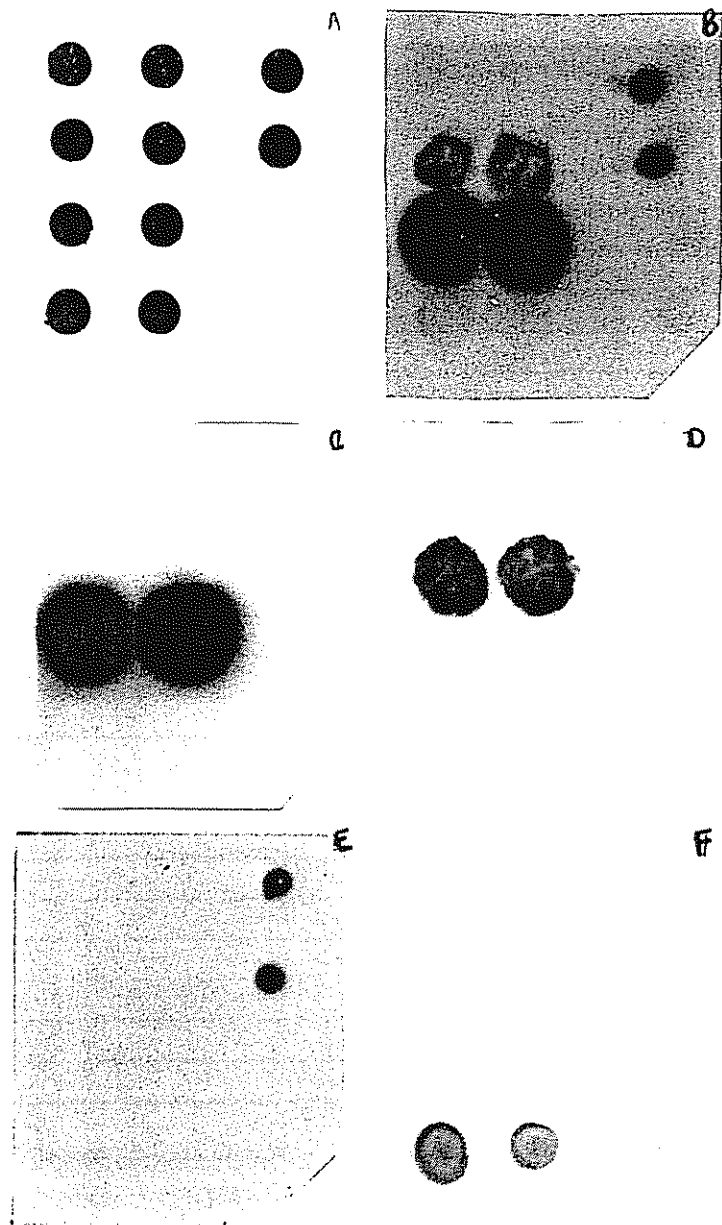


Figura 6. Evaluación de la especificidad de las sondas usadas en el análisis del tejido de frijol. 6A. Esquema con ADN control homólogo a las diferentes sondas. 6B-6F autoradiografía con sonda general, sonda BGMV-GA-B, sonda BDMV-B, sonda BGMV-BZ-B, y sonda "Bean calico B", respectivamente.

**Cuadro 5. Reacción de las sondas general y específica para la detección de geminivirus en pruebas de hibridación con extractos de tejido de frijido en diferentes comarcas del Valle de Pueblo Nuevo, Nicaragua (Lab.de Fitopatología de la Universidad de Wisconsin).**

Muestra	Prueba general	Prueba BGMV-GA-B	Prueba BGMV-BZ-B	Prueba BDMV-B	Prueba BCaMV-B
M1	++ +++	+++ +++	- -	- -	- +
M2	++ +++	+++ +++	- -	- -	- -
M3	+ -	+ ++	- -	- -	+ -
M4	+ -	+++ +++	- -	- -	- -
PA1	++ ++	- -	- -	+ +	- +
PA2	- -	- -	- -	- -	- -
PA3	++ ++	- -	- -	+++ ++	- -
PA4	++ ++	- -	- -	++ +++	- -
HA1	- -	- -	- -	- -	+ -
HA2	- -	- -	- -	- -	- -
HA3	- -	- -	- -	- -	- -
HA4	- -	- -	- -	- -	- -
CB1	- -	- -	- -	- -	- -
CB2	+++ +++	+++ +++	- -	- -	- -
CB3	+ +	+ +	- -	- -	- -
CB4	- -	- -	- -	+ +	- -
RA1	++ ++	+++ +++	- +	- -	+ -
RA2	+++ +++	+++ +++	- -	- -	++ -
RA3	- -	- -	++ +	- -	++ -
RA4	- -	- -	++ +	+ +	- -
CO1	- -	- -	+ +	- -	- -
CO2	- -	- -	+ +	+ +	- -
CO3	- -	- -	- -	+ -	- -
CO4	- -	- -	- -	- -	- -

+ Positivo débil; ++ Positivo moderado; +++ Positivo fuerte - Negativo.

M1-M4 muestras de Motolin; PA1-PA4 muestras de La Palagua HA1-HA4 muestras de Los Hatillos; CB1-CB4 muestras de Casa Blanca; RA1-RA4 muestras de Río Abajo; CO1-CO4 muestras de El Consuelo. Cada columna representa una repetición.

Con la sonda BDMV-B un 8% de las muestras presentó una reacción positiva fuerte, un 17% una reacción positiva débil y un 75% una reacción negativa (Cuadro 5).

De acuerdo a la procedencia de las muestras la identificación de geminivirus de frijol se presentó de la siguiente manera:

**Motolín.** Las cuatro muestras reaccionaron positivamente con la sonda general y con la sonda específica BGMV-GA-B. Se observó un positivo débil en dos de las muestras para la sonda BCaMV-B (Cuadro 5).

**La Palagua.** De las cuatro muestras analizadas, tres resultaron con positivo (moderado) para la sonda general y para la sonda específica de BDMV-B (Cuadro 5).

**Los Hatillos.** Ninguna de las muestras resultó positiva en los análisis de detección e identificación para geminivirus, ni en las pruebas serológicas para el virus del mosaico rugoso. Sin embargo, hubo reacción positiva en la detección de un potyvirus.

**Casa Blanca.** Dos de las cuatro muestras reaccionaron positivamente con la sonda general, las cuales presentaron reacción positiva fuerte y débil, respectivamente para la sonda específica BGMV-GA-B. Además, se obtuvo un positivo débil para la sonda BDMV-B en una muestras que no había dado reacción con la sonda general (Cuadro 5).



**Río Abajo.** Dos de las cuatro muestras fueron positivas para la sonda general. Ambas muestras reaccionaron (positivo fuerte) para la sonda específica del BGMV-GA-B y con la sonda BCMV-B (una muestra con positivo débil, la otra con positivo moderado). Las otras dos muestras que no reaccionaron con la sonda general sí lo hicieron con diferente intensidad y en algunas en las repeticiones con las sondas específicas para BGMV-BZ-B, BDMV-b y BCaMV-B.

**El Consuelo.** Ninguna de las cuatro muestras reaccionó positivamente con la sonda general, es decir no se detectaron geminivirus. Sin embargo, una muestra reaccionó (positivo débil) con la sonda para el BGMV-BZ-B, otra con la sonda BDMV-B y una con ambas (Cuadro 5).

## **2. Análisis de muestras de malezas**

### **a. Síntomas**

Los síntomas presentados en malezas afectadas por virus en las diferentes comarcas consistieron en amarillamiento de las hojas en forma de mosaico, aunque tenían una apariencia vigorosa con floración y fructificación normal (Fig.7). La distribución de los individuos afectados fue al azar dentro de los agrupamientos y generalmente los rebrotes presentaron síntomas desde un inicio.

**b. Identificación de los geminivirus BGMV y BDMV por hibridación molecular en tejidos de *Sida spp***

Las muestras de malezas analizadas provinieron de las comarcas donde se presentaron mayor número de plantas infectadas y con mayor intensidad, escogiéndose: La Palagua, Motolin, Río Abajo y El Consuelo. Esta última fue utilizada para probar si la cantidad de solución colocada en las membranas era adecuada.

Los análisis se realizaron en dos fases usando cada una de las sondas por separado: BGMV-GA-B, BGMV-GA-A y BDMV-B previamente linearizadas con enzimas de restricción y marcadas con dCTP-<sup>32</sup>P (Cuadro 6). En la primera fase se procesaron las muestras de Río Abajo y Motolin y en la segunda fase se procesaron las plantas de La Palagua y El Consuelo, empleándose en esta fase la sonda BGMV-GA-A para aumentar la probabilidad de detección de geminivirus, ya que en la primera fase todas las muestras resultaron negativas con la sonda BGMV-B. Las sondas disponibles para la determinación de estos geminivirus de interés fueron BGMV-GA-B y BGMV-GA-A.

**Cuadro.6 Características de las sondas específicas empleadas en el análisis de los extractos vegetales de las malezas procedentes de Río Abajo, Motolin, La Palagua y El Consuelo, Valle Pueblo Nuevo, Nicaragua.**

Sonda	Comarca	Enzima de restricción	Concentración	Radioactividad incorporada
BGMV-GA-B	Río Abajo	EcoRI	17 ng/ $\mu$ l	45%
BGMV-GA-B	Motolin	EcoRI	17 ng/ $\mu$ l	45%
BDMV-B	Río Abajo	BamHI+PstI	20 ng/ $\mu$ l	48%
BDMV-B	Motolin	BamHI+PstI	20 ng/ $\mu$ l	48%
BGMV-GA-A	La Palagua	EcoRI	8 ng/ $\mu$ l	34%
BGMV-GA-A	El Consuelo	EcoRI	8 ng/ $\mu$ l	34%
BDMV-B	La Palagua	BamHI+PstI	20 ng/ $\mu$ l	33%
BDMV-B	El Consuelo	BamHI+PstI	20 ng/ $\mu$ l	33%

El extracto vegetal obtenido de las muestras de malezas fue diferente al del cultivo de frijol, pues tenían apariencia viscosa y una textura gelatinosa, lo que dificultó la preparación de las membranas con el “Dot Blot”.

De acuerdo con la procedencia, la identificación de geminivirus en malezas se presentaron de la siguiente manera:

**Río Abajo.** En esta comarca se recolectó el 17% de plantas con síntomas virales de un total de 300 plantas. De las plantas sintomáticas, el 92% eran de *S. acuta* y el resto de *S. rhombifolia*, recolectándose el 54% de las plantas afectadas en el primer muestreo (Cuadro 7).

Todas las muestras de *Sida spp* provenientes de plantas con síntomas reaccionaron positivamente con la sonda BDMV-B, al ser comparadas con los valores del control negativo (Cuadro 7). Ninguna de las muestras reaccionó positivamente con la sonda BGMV GAB.

**Motolin.** Se obtuvo un 12% de plantas con síntomas, todas de *S. acuta*, recolectándose el 39% de ellas en el primer muestreo. Solamente un 22% de las plantas con síntomas manifestaron una reacción positiva para la sonda específica del BDMV-B, comparados con los valores del control negativo a mediana astringencia (Cuadro 7). Ninguna de las muestras reaccionó positivamente con la sonda BGMB-GA-B.

**Cuadro 7. Resultados de la hibridación de tejido de malezas recolectadas en las comarcas de Río Abajo y Motolín, Valle de Pueblo Nuevo, Nicaragua.**

Comarca	Muestras* síntomas	Especies		Sonda	
		<i>S.acuta</i>	<i>S.rhombifolia</i>	BGMV-GAB	BDMV-B
Río Abajo	50	46	4	-	50
Motolin	36	36	-	-	8

\* De un total de 300 plantas recolectadas por comarca.

**La Palagua.** El 14% de las plantas recolectadas (*S. acuta*) presentaron síntomas de virus. En el primer muestreo se recolectó el 60% del total de las plantas con virus.

El 65% de las muestras de plantas con síntomas tuvo una reacción positiva con la sonda específica del BDMV-B al compararse con los valores del control negativo a mediana

astringencia (Cuadro 8). El 100% de las muestras reaccionó positivo con la sonda del BGMV-GA-A.

**El Consuelo.** En esta comarca se recolectó el 15% de plantas con síntomas virales de un total de 300 plantas. La mayoría de las plantas afectadas (78%) eran *S. acuta*, el 22% *S. rhombifolia*, recolectándose el 33% de las plantas afectadas en el primer muestreo.

El 26% de las muestras con síntomas reaccionó positivamente con el BDMV-B al ser comparadas con los valores de las muestras negativas (Cuadro 8), de estas 2 plantas eran *S. rhombifolia*. El 22% de las muestras reaccionó positivamente con la sonda BGMV-A, siendo todas *S. acuta*.

**Cuadro 8. Resultados de la hibridación de tejido de malezas recolectadas en las comarcas La Palagua y El Consuelo, Valle Pueblo Nuevo, Nicaragua.**

Comarca	Muestras* síntomas	Especies		Sonda	
		<i>S.acuta</i>	<i>S.rhombifolia</i>	BGMV-GAA	BDMV-B
La Palagua	43	43	-	43	27
El Consuelo	46	36	10	10	12

\* De un total de 300 plantas recolectadas por comarca.



Figura 7. Síntomas de virus en las malezas del género *Sida*.

### 3. Presencia del virus según el nivel altitudinal

Los resultados de las muestras de frijol indican la presencia de virus en las diferentes altitudes del Valle, así como los resultados en malezas indican la presencia de posibles reservorios.

En el caso de las malezas, cuando se comparó la densidad relativa del ADN viral de las diferentes muestras entre los tres niveles de altitud, se encontró diferencia entre ellos respecto al BDMV (cuadro 9). También se encontró diferencia en el número de individuos reservorios de BDMV entre los niveles (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Comparación de la densidad relativa de ADN de las muestras de maleza de los diferentes niveles de altitud en el Valle de Pueblo Nuevo, Estelí, Nicaragua.**

Altitud (msnm)	Número de individuos reservorios	Densidad relativa promedio de ADN
< 500	50	118.02 B
600-700	8	113.16 B
> 1000	39	154.39 A

Columnas seguidas de la misma letra son iguales según prueba de Duncan al 5%.

#### 4. Caracterización molecular del geminivirus BGMV en frijol

Al aplicar el protocolo de Dellaporta a muestras de frijol, se extrajo el ADN total, lo que se confirmó al correr un gel de 70% agarosa. Sin embargo esas muestras no amplificaron por PCR. Los controles positivos y negativos utilizados fueron los indicados ya que en la amplificación el positivo se reveló y el negativo no. Al comparar el peso molecular del control positivo con el marcador de peso molecular se observó que el peso molecular del primero era el esperado con los iniciadores usados (CRC2 y 2039v), siendo este de 567 bases correspondiente al BGMV-GA.



## DISCUSION

La ausencia del cultivo de frijol en las diferentes zonas del Valle de Pueblo Nuevo durante la estación seca (febrero- mayo) hace suponer que el virus que afecta el frijol permanece en las plantas no cultivadas de la zona.

Según Harrison (1981), los virus clasificados como WILPAD pueden presentarse en ambas comunidades: cultivadas y no cultivadas. Estos virus tienen un amplio ámbito de hospedantes, lo que permite la infección de una gran cantidad de plantas en una comunidad y la persistencia en vectores alados aumenta la diseminación a largas distancias de la fuente de inóculo.

Thresh (1981), menciona que varios virus son llevados al cultivo por vectores que adquieren el virus de plantas no cultivadas que crecen alrededor de áreas agrícolas, mencionando entre los vectores a áfidos, moscas blancas, trips, saltahojas y nemátodos. También señala que malezas de áreas remotas pueden funcionar como fuentes de inóculo, dependiendo directamente de la movilidad del vector.

El BGMV y el BDMV son geminivirus que aparentemente, según resultados de estudios realizados por Bird (1958), Costa (1955) y Vakili (1973), pueden adaptarse a plantas no cultivadas, lo que garantizaría la sobrevivencia del agente causal en ausencia del cultivo. Su vector es *B. tabaci*, por lo que el virus podría ser transportado de las plantas no

cultivadas al cultivo, sobre todo cuando el insecto realiza vuelos largos en busca de nuevos hospedantes. Observando las características de sobrevivencia y dispersión, estos virus podrían ser incluidos dentro del grupo de los WILPAD mencionados por Harrison.

Los productores de frijol del Valle de Pueblo Nuevo señalan que los síntomas se presentan en mayor número de plantas y con mayor intensidad en la segunda siembra, es decir, en los meses de septiembre-octubre (postrera). Algunos de los síntomas están relacionados con geminivirus y en tal caso, el frijol del ciclo anterior (primera) funcionaría como reservorio para la siembra de postrera y la presencia del vector contribuiría a una mayor diseminación. Sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que los geminivirus permanezcan en cultivos diferentes al frijol, de allí la necesidad de realizar estudios adicionales que identifiquen los virus y sus hospedantes.

En Nicaragua se documentaron 19 especies de *Sida* (Flora de Nicaragua, 1995), siendo *S. acuta* y *S. rhombifolia* las más comunes y abundantes, con una amplia distribución en las diferentes zonas del país, presentándose en lugares perturbados, incluyendo sitios urbanos.

Ambas especies se distribuye en altitudes menores de los 1800 m.s.n.m., altitudes dentro de las cuales se ubican las comarcas seleccionadas para el estudio. Holm *et al.* (1991), describen a *S.acuta* como un arbusto pequeño, perenne, que se reproduce por semilla, nativo de América Central y disperso ampliamente en el trópico y subtrópico hasta los 1500 m.s.n.m., coincidiendo con los niveles de altitud en los que se encontró la especie en

el presente trabajo. En la Flora de Nicaragua (1995), se informa que *S. acuta* se encuentra distribuida en todos los departamentos de Nicaragua .

En las áreas muestreadas, *S. acuta* fue más frecuente que *S. rhombifolia* (Cuadro 3 y 4), lo que podría deberse a que por ser del mismo género posiblemente poseen requerimientos ambientales similares y coexisten en estas condiciones, pero la especie más adaptada es probablemente *S. acuta*.

La diferencia en la abundancia de ambas especies de *Sida*, que se observa entre las comarcas del segundo nivel Casa Blanca y Motolín (Cuadro 4), podría deberse a que la geografía y las actividades agrícolas son diferentes entre ambas comarcas, lo que influye en el tipo de flora. Motolin es una comarca situada en un área con mucha pendiente donde se cultiva tomate y granos básicos, principalmente frijol. Casa Blanca es una zona con poca pendiente a través de la cual pasan varios ríos, lo que permite que durante todo el año se cultiven hortalizas, granos básicos y, hasta hace poco tiempo, tabaco. Estas condiciones dan lugar a una mayor variedad en la flora silvestre.

La sintomatología encontrada en algunas plantas de frijol recolectadas coincide con la descrita por Morales y Niessen (1988), caracterizada como amarillamiento foliar, distorsión en las vainas y alto porcentaje de aborto floral en las plantas afectadas por el mosaico dorado. También coincide con la primera descripción del BGMV hecha por Costa (1965), en Brasil. La distribución al azar de las plantas con estos síntomas en los campos

de frijol sugieren la diseminación del agente causal por vectores; en el campo se observó la presencia de mosca blanca, probablemente *B. tabaci*, considerada vector de estos virus (Costa 1965; Brown y Bird 1992). Sin embargo, no se determinó el biotipo ni se cuantificó su presencia en las diferentes comarcas.

Gómez (1977), menciona al mosaico dorado y al virus de la clorosis infecciosa de las malváceas entre los principales virus que afectan al frijol en Nicaragua. Se conoce de la presencia del virus del mosaico común, mosaico amarillo, mosaico sureño y el del mosaico dorado en varias regiones del país, lo cual coincide con nuestros resultados para el caso del BGMV, identificado en algunas comarcas de Pueblo Nuevo<sup>5</sup>.

En Motolin, Río Abajo y Casa Blanca se encontraron plantas de frijol con mayor concentración relativa del BGMV que en La Palagua. En esta última comarca, sin embargo, se detectó una alta concentración relativa del BDMV y una baja concentración en plantas provenientes de Río Abajo y El Consuelo. Las comarcas estudiadas se ubican entre los 500 y los 1500 m.s.n.m., y hay informes que indican que el BGMV afecta al frijol en altitudes generalmente inferiores de los 2000 m.s.n.m. donde las poblaciones de *B. tabaci* son mayores. En Cuba y República Dominicana indican que la mayor frecuencia de virus se da en altitudes entre los 400 y 800 m.s.n.m. en verano, cuando las poblaciones de *B. tabaci* son mayores (CIAT, 1980). Gómez (1970) informa que en Guatemala, en alturas

---

<sup>5</sup> ROJAS, A., 1995. Escuela de Sanidad Vegetal. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua (Comunicación personal)

cercanas a los 2000 m.s.n.m., no se observó mosaico dorado; sin embargo, se encontraron plantas con síntomas en regiones bajas.

El otro tipo de sintomatología presente en los campos de frijol coincide con los descritos por Morales *et al.* (1990), (Costa 1965) para el BDMV: plantas con enanismo severo y amarillamiento. En la literatura el BDMV es referido también como moteado clorótico del frijol e infección clorótica de las malváceas (Gamez 1971; Morales *et al.* 1990), siendo los síntomas descritos para ellas similares a los encontrados en este estudio.

Previo a este estudio, la presencia o ausencia de estos virus se valoró mediante observaciones visuales y se sugirió la presencia del BGMV en 15 comarcas del Valle de Pueblo Nuevo<sup>6</sup>.

La presencia del BGMV y BDMV en el Valle podría representar problemas en un futuro, considerando una explosión poblacional del vector y condiciones favorables que podrían causar serias epidemias en el cultivo.

Los análisis serológicos de las muestras de Los Hatillos detectaron la presencia de potyvirus. Basados en la sintomatología y distribución de las plantas sintomáticas, se sospecha la presencia del mosaico común, el cual es transmitido por semilla. Moreno *et al.* (1968), describieron los síntomas del mosaico común como bandas verdes a lo largo de

---

<sup>6</sup> INTA. 1995. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estelí, Nicaragua. (Comunicación personal)

las venas malformación de las hojas trifoliadas que exhibían apariencia alargada, acopadas hacia abajo y ligeramente corrugadas, variando el grado de enanismo y la clorosis, síntomas que coinciden con los observados en este estudio.

Los síntomas observados en las malezas son muy similares y fáciles de confundir con los del BGMV en frijol. Sin embargo, al realizar los análisis de laboratorio se determinó la presencia de un virus relacionado al BDMV del frijol en algunas de las comarcas, lo que corrobora que los síntomas visuales no son un método de diagnóstico confiable para la identificación de enfermedades virales.

Esta investigación constituye el primer trabajo que utiliza técnicas moleculares para identificar virus en malezas del género *Sida* que son reservorios potenciales de virus que afectan al frijol, en Nicaragua.

El uso de técnicas moleculares para identificar virus relacionados con el frijol en plantas silvestres, presentó algunos problemas metodológicos. Los extractos vegetales de malezas aparentemente tenían un alto contenido de carbohidratos lo que produjo una textura gelatinosa que no permitió la filtración por la membrana de nylon del volumen indicado para el análisis. Sin embargo, la aplicación de 5 $\mu$ l de extracto permitió la hibridación en aquellas muestras positivas, lo que indica que con menos cantidad de tejido vegetal y menos reactivos se pueden detectar los virus, reduciendo los costos de insumos de laboratorio.

Desde los años 50 se ha especulado que las especies de *Sida* nativas se comportan como reservorios del virus que afecta a las malváceas (BDMV); algunos estudios que incluyeron inoculaciones artificiales mencionan algunas especies como reservorios (Costa, 1955).

En las cuatro comarcas estudiadas se encontraron individuos de *S. acuta* que actúan como reservorios de un virus relacionado con el BDMV. En la comarca donde se encontró el mayor número de estos reservorios (Río Abajo) se encontró el virus en el frijol en una de cuatro muestras (Cuadro 5). La mayor presencia en frijol del BDMV en La Palagua (Cuadro 5) puede deberse a que en esta comarca en comparación con el resto, hay menos variabilidad de cultivos forzando al insecto vector a permanecer en el frijol y a moverse en las áreas del cultivo por mayor tiempo. Esto podría ayudar a la eficiencia de transmisión.

La presencia limitada del BDMV en frijol en el Valle de Pueblo Nuevo podría deberse a que los materiales rústicos seleccionados y empleados por los productores exhiben algún nivel de tolerancia al virus. También podría especularse que ocurra variación genética del virus al pasar de las malezas al frijol, lo que no permitiría una reacción positiva con las sondas moleculares utilizadas para este estudio. Existe también la posibilidad que el biotipo de *Bemisia* presente en el valle, sobre todo en las comarcas donde no fue detectado el virus en frijol no acepte a las leguminosas como hospedantes alternos por lo que no permanecen el tiempo necesario para realizar la transmisión eficientemente.

El no encontrar reservorios dentro del género *Sida* del BGMV en las comarcas donde se presenta dicho virus en frijol (Cuadro 7), se podría deber a que en estas áreas existan otras malezas reservorios las cuales no fueron incluidas en el muestreo o a que en la población del vector *B. tabaci* existan formas con mayor movimiento migratorio, las cuales no se alimentan de reservorios silvestres alternos, al buscar nuevos hospedantes de frijol, sino que tienen la posibilidad de moverse grandes distancia (Byrne y Bellows 1991), transportando el virus e inóculándolo directamente en el frijol.

Gómez (1971), al realizar inoculaciones artificiales del BGMV a través de vector, encontró individuos de *S. rhombifolia* resistentes, pero 400 variedades de *Phaseolus* (Leguminosae) y especies cercanas resultaron susceptibles.

Flores y Silberschmidt (1967), en estudios sobre transmisión de la “clorosis de las malváceas”, usaron individuos de *Sida rhombifolia* como la principal fuente de virus, señalando que es una especie nativa infectada en forma natural. El hecho de que en este estudio se encontrara a *S. acuta* como mayor reservorio del BDMV cuando se compara con *S. rhombifolia*, puede deberse a que las muestras de plantas sintomáticas fue bastante uniforme, ya que el 92% de ellas eran *S. acuta*, especie predominante en los diferentes niveles estudiados.



En el caso del BDMV, las especies de *S. acuta* y *S. rhombifolia* podrían representar la fuente primaria de patógenos virales, ya que al ser plantas perennes, pueden retener el virus por tiempo tan prolongado como su ciclo de vida lo permita.

La relación encontrada entre el número de reservorios y la densidad relativa del virus en ellos, indica que basta una planta infectada para proporcionar inóculo suficiente para iniciar una epidemia, siempre y cuando el vector esté presente en una densidad adecuada.

El concepto de reservorio es importante cuando se analiza la epidemiología de enfermedades virales y su conocimiento es fundamental para entender el patosistema. La existencia de una o más especies susceptibles dentro de la vegetación silvestre ha sido considerada para tratar de explicar la presencia de este tipo de enfermedades en el tiempo y el espacio.

Con base en estos resultados, en el caso del BDMV, se propone que la malvácea reservorio principal para el inóculo primario es *S. acuta*, la que se encuentra en mayor abundancia y distribución en el Valle de Pueblo Nuevo

Los productores que residen en el Valle mencionaron que las áreas destinadas al cultivo de frijol se han reducido por la poca rentabilidad y baja productividad del frijol a lo que ha contribuido la afectación principalmente de mosca blanca posiblemente *B. tabaci*, y la enfermedad viral que causan los patógenos que ella trasmite. Esta transformación tiene

altos riesgos ya que los cultivos alternos como tomate y chiltoma son afectados por geminivirus transmitidos por *B. tabaci* y son hospedantes de ella, lo que aumenta el riesgo de diseminación de las enfermedades virales en la zona.

Un hecho importante es que la epidemia de los años 90 se dio cuando se eliminó el cultivo de tabaco de la zona, el cual es un hospedante del vector; la eliminación de este cultivo provocó posiblemente la emigración masiva del insecto al frijol, lo que aumentó el índice de la enfermedad.

La situación planteada demanda estudios epidemiológicos que determinen la identidad del patógeno, hospedantes silvestres, mecanismos de diseminación y aspectos ecológicos como el efecto de la lluvia, temperatura y un modelo que permita predecir los perjuicios causados por la presencia de la enfermedad en el campo, lo que contribuirá a tomar medidas de manejo adecuadas.

La amplificación del ADN viral través de PCR es necesaria para una plena caracterización de los virus encontrados tanto en frijoles como en las malezas reservorios del género *Sida*.

La falta de amplificación de ADN se debió tal vez a que las muestras se oxidaron, encontrándose gran cantidad de inhibidores en la solución obtenida que bloquearon la amplificación

## CONCLUSIONES

- ♦ Las principales especies del género *Sida* presentes son *S. acuta* y *S. rhombifolia*, predominando *S. acuta*. Ambas se encuentran distribuidas en todos los niveles altitudinales estudiados.
- ♦ Los virus que se encontraron afectando frijol en las comarcas estudiadas de Pueblo Nuevo están relacionadas con el virus del mosaico dorado que se encuentra en Guatemala (BGMV-GA) y Brasil (BGMV-BZ), con el virus del mosaico enano (BDMV) colombiano y en algunos casos con el virus del mosaico de Calico (BCaMV) mejicano.
- ♦ Basados en los resultados de hibridación de ADN se considera a *S. acuta* y *S. rhombifolia* como reservorios del BDMV en las comarcas Río Abajo, Motolin, La Palagua y El Consuelo.
- ♦ El BDMV afecta plantas silvestres del género *Sida*, por lo que se puede ubicar en el grupo de virus adaptados a plantas silvestres (WILPAD).
- ♦ En la comarca Los Hatillos no se detectó geminivirus en frijol, sin embargo fue detectada la presencia de un potyvirus.

## RECOMENDACIONES

- ◆ Caracterizar los virus encontrados en frijol y en malezas, para compararlos con los aislamientos caracterizados en otras regiones y así comprender la evolución y distribución de geminivirus en frijol.
  
- ◆ Ampliar este tipo de estudio a otras épocas del año, para incluir otras especies que podrían funcionar como reservorios potenciales de geminivirus.
  
- ◆ Confirmar los biotipos de *B. tabaci* presentes en la zona e identificar sus posibles hospedantes, para estudiar relaciones epidemiológicas.
  
- ◆ Realizar un estudio epidemiológico amplio en el Valle, que permita identificar los diversos problemas virales en los cultivos de importancia económica.

## LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. 1985. Fitopatología. 5 ed. Ed.LIMUSA, México, 756 p.
- ANDERSON, P.; GUHARAY, F.; CHAVARRIA, A. (Eds.) 1993. Memoria de Taller Nacional de Mosca Blanca, Nicaragua, CATIE/OIRSA 53 p.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D.; SEIDMAN, J.; SMITH, J.; STRUHL, K. (eds). 1992. Current protocols in molecular biology. vol 2.
- BELLOWS, T.; PERRING, T.; GILL, R.; HEADRICK, K. 1994. Description of species of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Annals of the Entomological Society of America 87(2):195-206.
- BETHKE, J.; PAINE, T.; NUSSLY, G. 1991. Comparative biology, morphometrics and development of two populations *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton and poinsettia. Annals of the Entomological Society of América 84(4):407-411.
- BIRD, J. 1957. A whitefly-transmitted mosaic of *Jatropha gossypifolia*. Agric. Exp. Stn. Univ. Puerto Rico 22:1-35. (Technical paper 22).
- \_\_\_\_\_ 1958. Infectious chlorosis of *Sida carpinifolia* in Puerto Rico . Agric. Exp. Stn. Univ. Puerto Rico. 26:1-23 (Technical paper 26).
- \_\_\_\_\_ MARAMOROSCH, K. 1978. Viruses and virus diseases associated with whiteflies. Advances in Virus Research 22:55-110.
- BLACKMER, J. L.; BYRNE, D. N. 1993. Flight of *Bemisia tabaci* in a vertical flight chamber: effect of time of day, sex, age and host quality. Physiological Entomology 18:223-232.
- BOS, L. 1983. Ecology of viruses. In Introduction to plant virology. Pudoc (ed.) 160 p.

- BROWN, J; BIRD, J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and Caribbean Basin. *Plant Disease (USA)* 76(3):220-225.
- \_\_\_\_\_. 1993. Evaluación crítica sobre los biotipos de mosca blanca en América, de 1989 a 1992. *In Las moscas blancas (Homoptera:Aleyrodidae) en América Central y el Caribe.* L.Hilje, O.Arboleda (eds.). CATIE Turrialba Costa Rica Serie Técnica. Informe técnico 205 p:1-9
- \_\_\_\_\_. COATS, S. A.; BEDFORD, Y. D.; MARKHAM P. G.; BIRD, J.; FROHLICH, D.R. 1995. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera:Aleyrodidae). *Biochemical Genetics* 33(7/8):205-213.
- BRUNT, A. A. 1986. Transmission of diseases. *In Bemisia tabaci a Literature Survey.* M.Cock (ed.) FAO-CAB-IICA International Institute of Biological Control. Ascot, UK. p:43-49.
- BURBAN, C.; FISHPOOL, L.; FAUQUET, C.; FARGETTE, D; THOUVENEL, L. 1992. Host-associated Biotypes within West African populations of the whitefly *Bemisia tabaci* (Genn) (Homoptera Aleyrodidae). *Journal of Applied Entomology* 113:416-423.
- BYRNE, D; BELLOWS, T.S. 1991. Whitefly biology. *Ann. Rev. Entomol.* 36:431-457.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 1980. Problemas de producción del frijol; enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. Victoria, J. traductor. H. Schwartz, G. Gálvez (eds.). Cali, Colombia 424 p.
- CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIO DE LA REFORMA AGRARIA 1988. Cifras Referenciales Documentables. Managua, Nicaragua 397 p.
- COCK, M. 1986. Population ecology. *In Bemisia tabaci a Literature Survey.* M.Cock (ed.). International Institute of Biological Control. Ascot, UK. p:37-42.

- COHEN, S.; DUFFUS, J.; LIU, H. 1992. A new *Bemisia tabaci* biotype in the southwestern United States and its role in silverleaf of squash and transmission of lettuce infectious yellows virus. *Phytopathology* 82:86-90.
- Comision Nacional de Mosca Blanca. 1992. Las moscas blancas en Nicaragua. *In* Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. L, Hilje, O, Arboleda.(eds.). Turrialba, Costa Rica, CATIE.
- COSTA, A. 1955. Studies on Abutilon Mosaic in Brazil. *Phytopathology*, Sao Paulo (Brazil) 24:97-112.
- \_\_\_\_\_. 1965. Three Whitefly-transmitted Virus Diseases of Beans in Sao Paulo, Brazil. *Plant Protection Bulletin (FAO)* 13(6):121-130.
- \_\_\_\_\_. 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 14:429-449.
- DUFFUS, J. E. 1987. Whitefly transmission of plant viruses. *In* Current topics in vector research 4:73-91.
- ESLAQUIT, X.; DAXAL, D.; MANZANARES, E. 1983. Guía fitosanitaria del frijol común *Phaseolus vulgaris* L. D.G.T.A./MIDINRA. Managua, Nicaragua 99 p.
- FLORES, E; SILBERSCHMIDT, K. 1967. Contribution to the problem of insect and mechanical transmission of infectious chlorosis of malvaceae and the disease displayed by *Abutilon thompsonii*. *Phytopathologisch Zeitschrift* 60:181-195.
- GALVEZ, G. 1975. Purification of the whitefly-transmitted bean golden mosaic virus. *Turrialba* 26(2):205-207.
- GAMEZ, R. 1969. Estudios preliminares sobre virus del frijol transmitidos por mosca blanca (Aleyrodidae) en El Salvador. *In* Reunión Anual Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. San Salvador (El Salvador) 67:32-34.

- \_\_\_\_\_. 1970a. El virus del moteado amarillo del frijol, plantas hospederas y efecto en producción. *In* 16 Reunión Anual Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de cultivos alimenticios. Antigua (Guatemala) 77:44-49.
- \_\_\_\_\_. 1970b. Observaciones y estudios preliminares sobre virus de frijol en Guatemala. *In* 17 Reunión Anual Programa Cooperativo Centro Americano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. Panamá (Panamá) p:41-42.
- \_\_\_\_\_. 1971. Los virus del frijol en Centro América. I. Transmisión por mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) y plantas hospedantes del virus del mosaico dorado. Turrialba 21(1):22-27.
- \_\_\_\_\_. 1977. Las enfermedades virales como factor limitante en la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en América Latina. Fitopatología 12(1):24-30.
- \_\_\_\_\_. 1982. Bean rugose mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses No 246.4 p
- GARCIA, L. 1988. Importancia socio-económica del frijol común. *In* Manual de producción frijol común. Ministerio de Desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria. H. Tapia; J. Alarcón (eds.). Managua, Nicaragua p :17-27.
- GERLING, D. 1990. Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Intercept Ltd., England. 348 p.
- GILBERTSON, R.; HIDAYAT, S.; MARTINEZ, R.; LEONG, S.; FARIA, J.; MORALES, F.; MAXWELL, D. 1991. Differentiation of bean infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. Plant Disease 75:336-342.
- GOODMAN, R.; BIRD, J. 1978. Bean golden mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses No 192.4p.



- GREATHEAD, H. A. 1986. Host plants. *In Bemisia tabaci* a Literature Survey. M. Cock (ed.). FAO-CAB-IICA International Institute of Biological Control. Ascot, UK. p:17-25.
- GRIFFITHS, E. 1978. Plant disease epidemiology retrospect and prospect. *In Plant disease epidemiology*. P.R. Scott (ed.). A. Bainbridge. Oxford, Blackwell Scientific Publications p:3-9.
- GUHARAY, F. 1994. Bioecología de mosca blanca *B. tabaci*: resultados de los estudios realizados en Nicaragua. *In Biología y Manejo del Complejo Mosca Blanca-Virosis III Taller Centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca*. M. Mata; D. Dardon; V. Salguero (eds.) p:73-84.
- HARRISON, B. 1981. Plant virus ecology: ingredients, interactions and environmental influences. *Ann. Appl. Biol.* 99. 195-209.
- HARRISON, B. D. 1985. Advances in geminivirus research. *Annu. Rev. Phytopathology*. 23:55-82.
- HIDAYAT, H; GILBETSON, R; HANSON, S; MORALES, F. 1993. Complete nucleotide sequences of the infectious cloned DNAs of bean dwarf mosaic geminivirus. *Phytopathology* 83(2):181-187.
- HILJE, L; ARBOLEDA, O. 1993. Las moscas blancas (Homoptera:Aleyrodidae) en América Central y El Caribe. CATIE. Serie Técnica No.205. 66p.
- HILJE, L. 1995. Aspectos bioecológicos de *Bemisia tabaci* en Mesoamérica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 35:46-54.
- HOELMER, K.; OSBORNE, L.; YOKOMI, R. 1991. Foliage disorders in Florida associated with feeding by sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Florida Entomologist* 74(1):162-166.
- HOLM, L; PLUCKNET, D; PANCHO, J; HERBERGER, J. 1991. The world's worst weeds: distribution and biology. 609 p.

- IRWIN, E. 1981. Epidemiología de virus y micoplasmas en ecosistemas de leguminosas con énfasis en soya. *In* Curso Internacional de control integrado de plagas. Antigua, Guatemala p: 95-115.
- KENT, M.; COKER, P. 1992. Vegetation description and analysis: a practical approach. Belhaven Press 335 p.
- LASTRA, R. 1987. Transmisión de virus por insectos. *In* Curso de Afidos. J. Pinochet y D. Quintero (eds.). CATIE. Panamá. Informe técnico No 125.
- \_\_\_\_\_. 1992. Los geminivirus: un grupo de fitovirus con características especiales. *In* Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. L. Hilje; O. Arboleda (eds.). CATIE, Turrialba, Costa Rica Serie Técnica. Informe técnico No. 205. p: 16-19.
- LIESNER, R. 1986. Field techniques used by Missouri Botanical Garden 21 p.
- LOPEZ-AVILA, A. 1986. Taxonomy and biology. *In* *Bemisia tabaci*: a literature survey. M. Cock (ed.). International Institute of Biological Control, Ascot, UK. p: 3-11.
- LLANO, A.; de CAMPO, C. 1988. Enfermedades del frijol. *In* Ministerio de Desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria. Manual de producción frijol común H. Tapia (ed.) Managua, Nicaragua 113-138.
- MAXWELL, D.; ROJAS, M.; GILBERTSON, R. 1994. Utilización de técnicas de hibridación de ácido nucleico (ADN) y de amplificación mediante polimerasa (PCR) para la detección de geminivirus transmitidos por mosca blanca. *In* Mosaico dorado del frijol. Avances investigación 1994. F. Morales (ed.). Colombia. CIAT. 193p.
- MEJIA, J.; NOLASCO, C.; CABALLERO, R. 1994. Hospedantes alternos del BGMV en Honduras. *In* Biología y manejo del complejo mosca blanca-virus. III Taller Centroamericano y del Caribe sobre Mosca Blanca. Antigua (Guatemala) p 127.

MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1992. Guía tecnológica para la producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Managua, Nicaragua, CNIGB/MAG.

MORALES, F. 1988. Bean common mosaic. AAB Description of Plant Viruses No 337.

\_\_\_\_\_. 1993. Los geminivirus transmitidos por mosca blanca. *In* Memoria II Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Managua, Nicaragua, p:9-16.

\_\_\_\_\_. 1994. Importancia del frijol en América Latina. *In* Mosaico dorado del frijol. Avances de Investigación 1994. F. Morales (ed.). Colombia. CIAT. 193p.

\_\_\_\_\_; NIESSEN, A. 1988. Comparative responses of selected *Phaseolus vulgaris* germplasm inoculated artificially and naturally with bean golden mosaic virus. *Plant Disease* 72(12):1020-1023.

\_\_\_\_\_; NIESSEN, A.; RAMIREZ, B.; CASTAÑO, M. 1990. Isolation and partial characterization of a geminivirus causing Bean Dwarf Mosaic. *Phytopathology (USA)* 80:96-101

MORENO, R; GAMEZ, R; GONZALEZ, L. 1968. El virus del mosaico común del frijol (*Phaseolus vulgaris*) en Costa Rica. *Turrialba* 18(3):257-263.

PINEDA, L. 1983. Las leguminosas de grano comestible en el desarrollo, producción y mejoramiento genético en Nicaragua. *In* Manual de producción de frijol común. Ministerio de Desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria H. Tapia; J. Alarcón (eds) Managua, Nicaragua p.27-41.

RAMIREZ, P; MAXWELL, D; 1994. Geminivirus transmitidos por moscas blancas. *In* Biología y manejo del complejo mosca blanca-virosis, III Taller Centroamericano y del Caribe sobre mosca blanca p:95-109.

RIVERA, E. 1994. Importancia del frijol en el Salvador. *In* Mosaico Dorado del Frijol, avances de investigación. Colombia CIAT p:40-44.

- RIVERA, D. 1996. Caracterización del Valle de Pueblo Nuevo. Tesis Ingeniero Agrónomo. Managua, Nicaragua Universidad Nacional Agraria (UNA).
- ROBYNS, A. 1965. Familia Malvaceae. *In* Flora de Panama R. Woodson; R. Schery (eds.). vol LII.
- RODRIGUEZ, R. 1994. Situación actual del Mosaico Dorado del frijol en la América Central, Guatemala. *In* Mosaico Dorado del Frijol, Avances de Investigación. Colombia, CIAT p:34-39.
- RODRIGUEZ, F.; DÍAZ, O.; ESCOTO, N. 1994. Situación actual Importancia del frijol en Honduras. *In* Mosaico Dorado del Frijol, Avances de Investigación. Colombia, CIAT p:34-39.
- ROJAS, A.; ANDERSON, P.; MORALES, F. 1994. Importancia del frijol en Nicaragua. *In* Mosaico dorado del frijol. Avances Investigación 1994. Colombia, CIAT. p:51-61.
- SALAZAR, F; QUERCI, M. 1992. Detection of viroids and viruses by nucleic acid probe. *In* techniques for the rapid detection of plant pathogens. J. Duncan; L. Torrance. (eds.). Blackwell Scientific Publications p:129-144.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. Laboratory manual 2da edición.
- STANDLEY, P; STEYERMARK, J. 1949. Flora de Guatemala. Fieldian:Botany Vol 24.
- STANLEY, J. 1985. The molecular biology of geminiviruses. *Advances in Virus Research* 30:139-177.
- STEVENS, W.D (de.). 1995. Flora de Nicaragua. Jardín Botánico de Missouri (en prensa).

- TAPIA, H.; CAMACHO, A. 1988. Manejo integrado de la producción de frijol basada en labranza cero. Eschborn, Alemania, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ). 181p.
- THRESH, J. 1981. The role of weeds and wild plants in the epidemiology of plant virus diseases. *In* Pest, pathogens and vegetation. J.M Thresh (ed.). London, UK, Pitman Books, Ltd. p53-70.
- TREMAINE, J.; HAMILTON, R. 1983. Southern bean mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No 274.5 p.
- VAKILI, N.; BIRD, J.; SANCHEZ, J.; WOODBURY, R. 1973. Wild hosts of whitefly transmitted viruses in tropical America. *In* 19 Reunión Anual Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. San Jose (Costa Rica).3p.
- VANDERPLANK, J. 1963. Plant diseases: epidemiology and control. New York, Academic Press.
- ZAMORA, M. 1988. Estudio preliminar de la relación mosca blanca-virus-maleza en frijol con riego en Nicaragua. Tesis Ing. Agr. Managua, Nicaragua Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias 30p.

ANEXOS

## Anexo.1 Hibridación de ácidos nucleicos para la identificación de geminivirus.

