

Revisión de los estudios realizados para la detección e identificación de los geminivirus transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius), utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Judith Piñero Bonilla¹, Hugo Cerda^{1*} y Eustaquio Arnal²

¹Instituto de Investigaciones Científicas y Tecnológicas - IDECYT
Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, Apdo. 47.925, Caracas 1041-A, Venezuela.

²Departamento de Protección Vegetal, Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias,
CENIAP-Maracay

Recibido: 31-03-98 Aceptado: 20-04-99

Resumen

La mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleroydidae), es una de las principales plagas que atacan diferentes cultivos en Venezuela y en el mundo entero como tomate, melón, patilla, berenjena, caraota, ajonjolí, yuca y tabaco, porque causa extensos daños al comer la planta y por la transmisión de virus de plantas como geminivirus. Por la importancia de las enfermedades virales transmitidas por la mosca blanca, en este trabajo se revisa la taxonomía molecular de los geminivirus en estudios que envuelven el uso de PCR y se discute el uso de esta técnica para el control de esta fitopatología.

Palabras clave: Geminivirus; mosca blanca *Bemisia tabaci*; PCR; plaga.

Review of the study for the detection and identification of the geminivirus transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) using the PCR technique

Abstract

The whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleroydidae) is an economically important pest in Venezuela and worldwide cultivates like tomato, melon, watermelon, eggplant, pea, sesame, cassava and tabaco because cause extensive damage by direct feeding and by the transmission of plant viruses, such as geminivirus. Because of the importance of whitefly-transmitted geminivirus, we review the molecular taxonomy of the geminivirus by the use of PCR and discuss the use of this techniques in the control of this phytopatogen.

Key words: Geminivirus; plant viruses; PCR; whitefly *Bemisia tabaci*.

* Autor para la correspondencia. Fax 58-2-682.5724, e-mail hcerda@reacciun.ve

Introducción

La mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius), se ha asociado con la agricultura desde hace mucho tiempo, sin embargo, en los últimos años (1989-1997) ha causado graves daños a diferentes especies vegetales de importancia económica, constituyéndose en plaga tanto en cultivos alimenticios de amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales, como de plantas y árboles ornamentales y forestales en los trópicos y de los invernaderos en la mayor parte de las regiones templadas (1, 2). Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) son insectos pequeños (0,5-1,2 mm) que se alimentan de las plantas mediante su aparato bucal del tipo perforador-chupador el cual les permite succionar savia. Durante este proceso, algunas especies, entre estas *Bemisia tabaci*, pueden transmitir partículas virales principalmente geminivirus, que ocasionan enfermedades a cultivos tales como tomate, papa, caraota, soya, algodón (3-9). Adicionalmente, pueden ocasionar daños directos en más de 20 cultivos registrados en Venezuela y un número de plantas hospederas superior a las 80 (10). Hasta el año 1985 en Venezuela se citaba a *B. tabaci*, atacando plantas de solanáceas, tales como papa, tabaco y tomate (sólo adultos, no colonizaba), caraota, otras leguminosas, Euphorbiaceas y algodón (11). A finales de 1990 y 1991 cambia la situación y se comienzan a observar fuertes ataques a plantas de la familia Cucurbitacea (melón, patilla y pepino) que antes no eran colonizadas por el insecto, se inicia la colonización en el tomate y numerosas malezas (10). Las altas poblaciones del insecto originan mucha excreción azucarada que permiten el crecimiento y desarrollo de hongos negros que recubren las plantas (1, 12).

Existen registros por daños de *B. tabaci* a leguminosas del género *Phaseolus* en Suramérica (13); tomates en Norte, Centro y Suramérica (13), el Mediterráneo (14) y el sur de Europa (15), el Medio Este (los países del Suroeste del Asia) (16), Asia (17) y Australia (18); la yuca en Africa (19) y la India

(20); algodón en Pakistán (21) y el Sudán (22), Centro y Norteamérica (23) y numerosas cosechas de leguminosas y vegetales a través de Asia y el Lejano Oriente. Durante el período 1991-1996 se agrava la situación por los daños causados y las pérdidas cuantiosas en la agricultura. En Cucurbitáceas como el melón, patilla y pepino, los daños directos por succión de savia pueden causar pérdidas totales cuando ataca durante el primer cultivo, y con altas poblaciones; mientras que en el tomate (24), determinaron que en las plantas con síntomas de mosaico amarillo del tomate (MAT) durante la primera semana después del trasplante reducen su rendimiento hasta un 79%. Algunos autores (25-27), plantean la existencia de razas, subespecies y ecotipos en *B. tabaci*, citándose en Centroamérica (28, 29) la existencia de las razas: A, B, C, D y G. Más recientemente, la raza B fue descrita por Bellows *et al.* (30) como la especie *Bemisia argentifolli* Bellows y Perring. En Venezuela no se ha aclarado qué especies y razas son las que están actuando en los diferentes agroecosistemas.

El repentino ascenso de las moscas blancas como una plaga ha estado ligada a la aparición de cepas resistentes, altamente fecundas y portadoras de virus patógenos. El mismo uso indiscriminado de los pesticidas, especialmente de los piretroides, se cree que es el responsable de la alta proliferación de este insecto debido a que está disminuyendo la población de su controlador natural que es un microhimenóptero que parasita los huevos y las ninfas del insecto (1, 2, 12).

Las moscas blancas son insectos pequeños que pertenecen al Orden Homoptera y a la Familia Aleyrodidae. Arnald (31) cita en Venezuela 19 géneros de moscas blancas, con 20 especies determinadas y 12 no determinadas. En el género *Bemisia*, una de las especies a la que se le ha dado mayor importancia es a *Bemisia tabaci* (Gennadius), a la cual se le ha denominado también la mosca del tabaco, de la batata o del algodón,

esta especie transmite alrededor de 60 virus vegetales diferentes (16), perteneciente a los grupos geminivirus, carlavirus, potivirus, closterovirus, nepovirus y un virus de DNA en forma de bastón, muchos de los cuales no están bien caracterizados y muchos se han asignado a otros grupos cuando existen más datos disponibles. La mayoría de los virus transmitidos por esta especie pertenecen a los geminivirus. Para los geminivirus, la interacción entre el virus y el vector, se describe como circulativa y no propagativa, esto significa que el virus es adquirido durante la alimentación, y pasa a través de células específicas en el tracto digestivo para entrar en la hemolinfa antes de salir del insecto durante la alimentación, vía las glándulas salivales (2).

Los geminivirus son un grupo de virus vegetales pequeños que se caracterizan por poseer un virión isométrico doble o geminado (20-30 nm) del cual deriva el nombre de este grupo, y un genoma de DNA circular de una sola banda (32-39). Los geminivirus de acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)) se subdividen en tres subgrupos principales en base al insecto vector, rango de huéspedes y estructura genómica (40):

- Subgrupo I: Aquellos que tienen un genoma monopartito, que son transmitidos por "leafhopper", y que infectan plantas monocotiledóneas.
- Subgrupo II: Aquellos que tienen un genoma monopartito, que son transmitidos por "leafhopper", y que infectan plantas dicotiledóneas.
- Subgrupo III: Aquellos que tienen un genoma bipartito, que son transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) y que infectan plantas dicotiledóneas.

Debido a la importancia cada vez mayor de los geminivirus transmitidos por la mosca blanca, se requieren métodos rápi-

dos y seguros para su detección e identificación. Estos métodos podrían facilitar enormemente los estudios de la epidemiología y la diversidad genética de este grupo de virus lo que tendría repercusiones importantes en el diseño de las estrategias para el control de las enfermedades. Uno de los principales problemas, especialmente los asociados con las moscas blancas es que desarrollan resistencia contra muchos insecticidas organofosforados y piretroides y, cuando el problema es la infección viral, el control mediante el uso de estos plaguicidas es limitado (2).

Existen evidencias indirectas (41) y directas (42) de que la cápsula proteica de los geminivirus es esencial para el reconocimiento del vector, la transmisión y determina la especificidad del vector de los geminivirus. Esto se puede demostrar cambiando el gen de la cubierta proteica entre los virus (42). Las partículas de los geminivirus transmitidos por *B. tabaci* que infectan muchas especies de cultivos dicotiledóneos, en muchas regiones tropicales y subtropicales están relacionadas serológicamente, aunque la mayor parte de los virus se pueden distinguir por sus patrones de reactividad con paneles de anticuerpos monoclonales (43-46). Sin embargo, los geminivirus transmitidos por la mosca blanca de diferentes hospederos en la misma área geográfica tienden a ser antigénicamente más similares unos de otros que aquellos que causan la enfermedad en los mismos hospederos en otras regiones geográfica (43). Este hecho se podría explicar si la cápsula proteica de cada virus está adaptada específicamente para la transmisibilidad por el o los biotipo(s) del género *Bemisia* en su área de ocurrencia (47).

Muchos de los brotes virales nuevos y recientes, probablemente están asociados con geminivirus conocidos que infectan un huésped alternativo como resultado de la actividad de un nuevo biotipo identificado de *B. tabaci*, el biotipo B que tiene un amplio rango de hospederos (comparado con otros biotipos), posiblemente más de 600 especies

(2). La aparición del biotipo B en muchas localidades diferentes (48, 49, 16) se ha asociado con el comercio de las plantas ornamentales (12). Algunas especies de plantas ornamentales son, particularmente buenas plantas hospederas del biotipo B, tales como poinsettia, begonia y gipsofila. El biotipo B ahora ha sido identificado en el Medio Oriente, la Cuenca Caribeña, Centro y Norteamérica, Japón, Sudáfrica, Sur de Europa y en los invernaderos del Norte del Europa (49).

Métodos de detección e identificación de los geminivirus

La taxonomía de los virus ha mejorado mucho en la medida que se ha tenido más información en relación a la naturaleza física y química de ellos. Los métodos más tradicionales para la detección y diagnóstico se han basado en la expresión de los síntomas de la enfermedad en las plantas y la transmisión de los virus a las mismas, con frecuencia con la ayuda de un vector específico (34), o el rango de hospederas que depende del genotipo tanto del virus como de la planta hospedera (50). Incluso se han hecho observaciones citopatológicas con microscopía electrónica (19, 51-56, 20) pero la mayoría de ellas se han combinado con otras técnicas especialmente con pruebas serológicas como se verá más adelante. Los esquemas de clasificación corrientes que se han utilizado para distinguir los virus en familias, géneros o grupos han considerado características tales como el tipo de ácido nucleico, morfología de la partícula y forma de replicación (37). La diferenciación de las taxa virales con frecuencia se basan en características como el rango de hospederas y las relaciones serológicas (57). La composición en aminoácidos de la cápside proteica también es comúnmente usada para determinar las filogenias de los virus vegetales (58, 59).

Las relaciones virales se pueden detectar mediante varias pruebas serológicas tales como la pruebas de inmunodifusión

como la de la precipitina en gel (53, 54, 60, 41, 61, 46). Los estudios citopatológicos basados en la técnica de la microscopía electrónica inmunoabsorbente (ISEM del inglés immunosorbent electron microscopy) ha sido utilizada en algunos estudios de geminivirus (43, 41, 61, 46), sin embargo, las partículas virales se rompen o dañan en algunos buffers y muestran un contraste relativamente pobre en la mayor parte de las cepas (41,61).

El sistema ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay = ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas) generalmente es más aplicable y ha dado resultados prometedores con los virus del mosaico amarillo del enrollamiento de la hoja de la auyama (SYLCV del inglés squash yellow leaf curl virus) (61-64). La tecnología de los anticuerpos monoclonales y policlonales ha suministrado los medios para la producción de anticuerpos con diferentes especificidades y capacidad discriminatoria que ha permitido la diferenciación serológica de un número de cepas y variantes virales (43, 60, 20, 65, 66, 45, 56, 46). El límite de detección viral del método ELISA según Weidemann (67) está en el rango de 20-100 ng mientras que Van Regenmortel (68) encontró que el sistema TAS-ELISA (Triple antibody sandwich ELISA) daba una sensibilidad entre 1-10 ng por mL de virus.

Las partículas geminivirales se encuentran en las plantas generalmente en concentraciones moderadas a bajas que no son adecuadas para la detección por medio de pruebas serológicas (34).

Los ensayos de la mancha de hibridación que usan sondas clonadas marcadas con ^{32}P han sido útiles en el caso del virus del mosaico de la yuca africana (41, 69), para la discriminación de cepas de geminivirus de cucurbitáceas (66), para la diferenciación de los geminivirus que infectan la caraota (52), para el reconocimiento y diferenciación de siete geminivirus de la India y establecer su relación con los virus del mo-

saico de la yuca africana y el mosaico amarillo de la caraota "mung" de Tailandia (70), incluso en aislados que no parecían producir partículas virales.

La detección puede ser más simple que el diagnóstico, que es complicado debido a las relaciones serológicas y las homologías en la secuencia nucleotídica entre los geminivirus transmitidos por la mosca blanca. Actualmente el perfeccionamiento de las técnicas genéticas más sofisticadas ha permitido estudios más confiables para detectar y medir la variación genética de especies animales, vegetales y microorganismos, especialmente las variaciones en el DNA. Estas técnicas son los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP del inglés restriction fragment length polymorphism), el número variable de polimorfismos por repeticiones en tándem (VNTR del inglés variable number of tandem repeats), las amplificaciones del DNA usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés polymerase chain reaction), la secuenciación del DNA mediante el procedimiento de la terminación dideoxynucleótido, la detección de las mutaciones del DNA mediante electroforesis en gradiente de gel desnaturante, entre otras.

Los métodos RFLP y VNTR que dependen típicamente de los procedimientos de clonación y de "Southern blot" han mostrado su utilidad en muchas aplicaciones, sin embargo, tienen sus limitaciones debido a que la clonación requiere mucho tiempo, a menudo una semana o más, de trabajo en el laboratorio y el método estándar de mancha de "Southern blot" necesita grandes cantidades de DNA purificado, en general varios microgramos (71). Haber *et al.* (72) mostraron que el análisis del RFLP y el "Southern blot" eran técnicas útiles para diferenciar los geminivirus que infectan varias plantas colectadas en Puerto Rico. El RFLP se podría combinar con hibridaciones con sondas de geminivirus no radiactivos como una técnica de diagnóstico efectiva (73).

La PCR es un método nuevo para efectuar copias de DNA que ha incrementado la eficiencia de la detección de la variación genética a nivel del DNA. Es un medio artificial de replicación de una secuencia corta de DNA (varias kilobases o menos) con rapidez, de tal manera que pueden hacerse millones de copias de la secuencia. La PCR presenta una serie de ventajas sobre otras técnicas menos modernas (71):

1. Puede utilizarse con cantidades muy pequeñas de DNA, del orden de los nanogramos o picogramos.
2. El procedimiento es mucho más rápido que las técnicas antiguas ya que no necesita clonación genética.
3. La PCR puede generar grandes cantidades de DNA muy puro, por lo que no suele ser necesario emplear sondas radiactivas (como es el caso de RFLP y VNTR) para detectar mutaciones o secuencias de DNA específicas, en su lugar se pueden utilizar sustancias marcadas no radiactivas, más seguras, como la biotina.

Sin embargo, la PCR tiene dos inconvenientes: 1) La síntesis del cebador requiere el conocimiento de la secuencia de DNA que flanquea al DNA investigado. Cuando no se dispone de la información de la secuencia, deben emplearse otras técnicas. 2) La extrema sensibilidad de la PCR la hace susceptible para la contaminación en el laboratorio (71).

Actualmente se dispone de las secuencias publicadas de los genomas de varios geminivirus transmitidos por la mosca blanca determinadas mediante técnicas de clonación y secuenciación por el método de la terminación de dideoxynucleótidos lo que ha permitido establecer algunas relaciones filogenéticas entre los geminivirus transmitidos por este insecto (74-90, 72, 18, 44, 17) y en algunos casos utilizar las técnicas de la PCR para clasificar e identificar los geminivirus (73, 80, 91-98).

Padidam *et al.* (44) compararon los genomas de 36 geminivirus (previamente secuenciados) y determinaron que la comparación de las secuencias se podía utilizar para clasificarlos, clonando y secuenciando regiones genómicas cortas mediante primers altamente conservados de la PCR.

La PCR debido a su potencia y versatilidad se le está empleando extensamente en la actualidad, sustituyendo al método "Southern blot" en muchas aplicaciones y en algunos casos se utiliza para generar RFLP y VNTR (71).

La técnica de la PCR aplicada a la detección e identificación de geminivirus

Los otros métodos para la caracterización de los geminivirus transmitidos por la mosca blanca involucran una extracción del DNA y procedimientos de clonación laboriosos (81). La PCR es una técnica extremadamente sensible y específica (99, 100) para la detección e identificación de patógenos vegetales, y se puede usar para investigar aspectos precisos sobre la composición de las poblaciones de patógenos y la diversidad genética de los virus (91, 96) así como para establecer relaciones filogenéticas entre ellos. La especificidad de la PCR se basa en el uso de cebadores oligonucleótidos que son complementarios con la regiones que flanquean la secuencia de DNA a ser amplificada. Debido a que la PCR amplifica los ácidos nucleicos, la técnica podría ser útil para superar muchas de las dificultades actuales asociadas con los métodos de detección serológicos, empleados tradicionalmente en los estudios epidemiológicos de los virus vegetales, como por ejemplo, la baja concentración del antígeno, las reacciones cruzadas de anticuerpos con antígenos heterólogos, y desarrollo o regulación ambiental de la producción de antígenos. Además, pueden utilizarse pequeñas cantidades de muestras vegetales frescas, congeladas o secas (73).

Las técnicas de la PCR se han empleado en la detección y determinación de la variabilidad genética de los virus vegetales tales como luteovirus (101, 96), potivirus (92, 98), geminivirus transmitidos por "leafhopper" que infectan plantas monocotiledóneas (97), y los geminivirus transmitidos por la mosca blanca, virus del mosaico amarillo de la caraota (91) y el geminivirus del mosaico amarillo del enrollamiento de la hoja del tomate (94).

Los geminivirus son organismos apropiados para la detección e identificación por la PCR debido a que ellos se replican vía un DNA circular intermedio de dos bandas, lo que se ha denominado la forma replicativa (39) que puede servir como un patrón para la amplificación por la PCR. El genoma de muchos geminivirus transmitidos por la mosca blanca, en los que se ha logrado una buena caracterización, está compuesto de dos componentes de DNA que se han designado como DNA-A y DNA-B. Basándose en métodos diferentes a la PCR han sido obtenidas las secuencias completas de los nucleótidos de cinco geminivirus bipartitos transmitidos por la mosca blanca del Hemisferio Oeste (75, 102, 78, 81, 83, 103) y el geminivirus del mosaico de la yuca de Africa más distintamente relacionado del Hemisferio Este (87). Actualmente la disponibilidad de la información sobre las secuencias genómicas obtenida a partir de los métodos de clonación del DNA ha facilitado la aplicación de técnicas moleculares para detectar y caracterizar lo geminivirus. Rojas *et al.* (datos no publicados) determinaron la secuencia de otros cuatro geminivirus bipartitos que infectan la caraota aislados del Hemisferio Oeste, y las utilizaron para el diseño de cebadores degenerados de la PCR para detectar y diferenciar los geminivirus transmitidos por la mosca blanca de las Américas, la Cuenca del Caribe y Africa (73).

Nickolai *et al.* (95) le dieron aplicación a la técnica de la PCR para determinar las fuentes de resistencia natural de especies silvestres de tomate (*Lycopersicon*) al virus

del mosaico amarillo del tomate (ToYMV del inglés tomato yellow mosaic virus) con la finalidad de utilizarles para mejorar las especies de tomate cultivadas. Las fuentes de obtención de las muestras para el análisis son de origen vegetal, el DNA total se extrajo de las plantas y se amplificó mediante la utilización de cebadores o "primers" degenerados. Para caracterizar mejor la resistencia y tolerancia al virus se usó la PCR en combinación con ensayos tradicionales de transmisión por inoculación mecánica ("back-inoculation"), y con el insecto *B. tabaci*. El análisis de la PCR mostró que el DNA viral está presente en plantas infectadas y ausente en las resistentes mientras que la transmisión mecánica a través del insecto dió resultados diferentes en algunas especies o cultivos. Esta diferencia en la respuesta a la infección basada en el método de inoculación sugirió un mecanismo para la resistencia que puede ser la evasión a la transmisión por el insecto vector o inhibición de la entrada inicialmente del virus en las células vegetales.

Rojas *et al.* (73) emplearon cebadores degenerados de la PCR para detectar y diferenciar geminivirus transmitidos por la mosca blanca de varias regiones de América, la Cuenca del Caribe y África. Los virus con los cuales trabajaron fueron el virus del mosaico dorado de la caraota (BGMV del inglés bean golden mosaic virus) de Guatemala y República dominicana y el virus del mosaico enano de la caraota (BDMV del inglés bean dwarf mosaic virus) que fueron mantenidos en *Phaseolus vulgaris* L. cv "Topcrop" mediante inoculación de savia (52); se inocularon caraotas con DNA clonado de BGMV de Brasil usando el método de la aceleración de partículas por descarga eléctrica (52); los virus que infectan el tomate de Florida, México y Costa Rica se mantuvieron en *Nicotiana benthamiana* Domin. por inoculación de savia. El DNA viral a ser amplificado por la PCR se obtuvo de estas fuentes vegetales mediante extracción con los métodos referidos por los autores. Según estos auto-

res los métodos utilizados por ellos facilitaron la caracterización molecular del grupo de geminivirus estudiados, sin embargo, la PCR se usó en combinación con RFLP, un método también fácil para caracterizar los fragmentos amplificados de la PCR lo que permitió distinguir los geminivirus ya conocidos de otros no caracterizados y que da buenos resultados en los casos de infección de virus mezclados.

Hong *et al.* (79) también utilizaron primers degenerados de la PCR para diferenciar tres geminivirus distintos transmitidos por la mosca blanca en la yuca (*N. benthamiana*). Estos virus eran el virus del mosaico de la yuca de la India (ICMV del inglés Indian cassava mosaic virus) obtenido de una planta de yuca propagada vegetativamente derivada de una estaca y transmitido por inoculación de savia a *N. benthamiana* y mantenida en ella por inoculación mecánica; el virus del mosaico de la yuca de África de Malawi (ACMV-M del inglés African cassava mosaic virus - Malawi) obtenido de una planta de yuca y propagada vegetativamente en el invernadero; y el virus de ACMV de Kenia (ACMV-K). El DNA viral se extrajo de partículas purificadas del virus y de las hojas de *N. benthamiana*. La PCR junto con técnicas de clonación permitieron establecer diferencias considerables entre estos tres geminivirus para justificar su separación como tres aislados virales distintos.

Nakhla *et al.* (92) caracterizaron molecularmente el virus TYLCV (Tomato yellow leaf curl virus) de Egipto (TYLVC-EG1) mediante amplificación de un fragmento del DNA viral por la PCR. Colectaron un aislado que fue transmitido experimentalmente a plantas de tomate por la mosca blanca *B. tabaci* (Gennadius) y a *N. benthamiana* L. mediante injerto. Los resultados y comparaciones permitieron establecer que el TYLVC-EG1 no está estrechamente relacionado con el TYLVC de Tailandia y es casi idéntico al TYLVC de Israel.

La mayoría de los estudios para la detección e identificación de los geminivirus parten de muestras vegetales o partículas virales puras. Para fines experimentales los geminivirus son aislados de sus fuentes vegetales naturales o de plantas previamente inoculadas para la propagación y mantenimiento del virus. Sin embargo, Navot *et al.* (93) utilizaron la PCR para amplificar el DNA de un aislado israelí del "tomato yellow leaf curl virus" (TYLCV) de moscas blancas. Amplificaron el DNA a partir de los extractos totales de DNA de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) infectadas con este virus, y también de los extractos de ácido nucleico de individuos de mosca blanca. Ensayaron la aplicabilidad del método para estudios epidemiológicos experimentando con moscas blancas de campos cultivados con caaota en la Planicie Costera de Israel en las cuales se sospechaba la presencia de TYLCV. El DNA de TYLVC se amplificó de un extracto total de ácidos nucleicos de insectos individuales aislándose un fragmento de DNA con el mismo número de pares de bases (440) y la misma movilidad como el fragmento amplificado de las moscas blancas que se alimentaban en plantas de tomate infectadas con TYLVC. La identidad de los fragmentos de DNA amplificado de TYLVC se confirmaron utilizando las técnicas de hibridación con sondas de DNA de TYLVC y análisis con enzimas de restricción.

Navot *et al.* (93) determinaron el nivel de detección del DNA viral en las moscas blancas, mezclando el DNA de una sola mosca blanca virulífera con el DNA de moscas blancas crías en plantas no infectadas con el virus para alcanzar diluciones 1/10 del DNA del insecto portador del virus. Después de una dilución 1/1000, se obtenían resultados de la PCR. De forma alternativa, el DNA de una sola mosca blanca virulífera y de una planta de tomate infectada se sometieron a una serie de diluciones seriadas en agua, el DNA de TYLVC fue amplificado a partir de estas diluciones en una dilución hasta 10^{-9} no obteniéndose señal de la PCR

con diluciones mayores. El DNA de TYLVC puede ser detectado por el método de hibridación de "Southern blot" con un nivel de detección en el rango de 0.5 pg de DNA o lo que es lo mismo 300.000 copias de genoma viral (10^4) mientras que las secuencias virales amplificadas por la PCR detecta niveles de DNA de una sola mosca blanca diluida hasta 10^{-9} . La amplificación por la PCR del TYLVC en una sola mosca blanca ha permitido identificar la infección de caaotas por este virus en campos abiertos.

Gilbertson *et al.* (90) utilizaron una variante de la PCR, la PCR asimétrica (A-PCR) junto con la secuenciación del DNA para determinar la variabilidad genética de los geminivirus del mosaico dorado de la caaota en la República Dominicana (BGMV-DR). El DNA se extrajo del tejido foliar de las caaotas infectadas con el virus en cinco localidades diferentes del campo de ese país, se amplió la región hipervariable mediante la PCR y se produjo el DNA de una sola banda (ssDNA single-strand DNA) usando la A-PCR, y se determinó la secuencia nucleotídica parcial. Un paso importante en la producción de ADN patrón de alta calidad por la A-PCR era la amplificación inicial del fragmento "target" por la PCR y su posterior aislamiento en gel de agarosa, de esta forma se tienen más DNA para la A-PCR y se eliminan además, algunos factores del medio del DNA y contaminantes que pueden interferir con las reacciones de la A-PCR y/o de la secuenciación. Estos autores encontraron que la técnica de la PCR implementada por ellos se puede desarrollar para determinar mezclas de infecciones producidas por varios geminivirus en el campo y así detectar e identificar los geminivirus en general. El procedimiento utilizado para aislar el DNA por la amplificación de la PCR es muy simple y se puede aplicar para analizar un número alto de muestras en poco tiempo y en varias condiciones, es decir, muestras frescas, secas o congeladas. Los autores utilizaron tejidos secados al aire que habían sido almacenados por aproximadamente cuatro meses

permitiendo de esta forma mayor flexibilidad en el manejo del material. Por otro lado, el método se puede utilizar para determinar la secuencia de una determinada región del genoma viral, que permita la identificación específica de un aislado viral.

Rybicki y Hughes (97) utilizaron la amplificación de la PCR mediante el uso de primers degenerados para detectar y tipificar el geminivirus "maize streak" (MSV) y otros geminivirus distantemente relacionados en el Sur de Africa. El DNA se extrajo de plantas infectadas por los virus utilizados. En este trabajo los autores también utilizaron la técnica de hibridización (Southern blot). Los resultados mostraron que el PCR puede ser usada para la amplificación y detección de las secuencias de los segmentos de los genomas virales que no hibridizan bajo condiciones de detección normales. Una vez generados los fragmentos de DNA se pueden tipificar por los análisis de hibridización y secuenciación como se hizo en este trabajo y en el de Puchta y Sanger (105) que suministra datos que pueden ser usados directamente con fines de clasificación.

El mejoramiento de las técnicas para la detección e identificación de los geminivirus se hace necesario para determinar las estrategias de control de éstos que están representando un serio problema para el desarrollo de ciertos renglones agrícolas y que ha traído pérdidas económicas importantes en muchas regiones de América, Asia, Africa y Europa. Una de estas estrategias sería la transformación de las plantas con partes del genoma viral lo que puede ser útil para combatir la infección del virus en la planta y la replicación de éste (106). Los geminivirus se encuentran entre los virus conocidos más pequeños que se replican automáticamente (35) por lo que están entre los virus más estudiados debido a su utilidad potencial en ingeniería genética vegetal (107).

Referencias Bibliográficas

1. BRICEÑO A.J. La mosca blanca. Peligro para los cultivos de los Andes. Boletín Divulgativo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Los Andes. N° 1-4. pp. 12-15, 1992.
2. MARKHAM P.G., BEDFORD I.D., LIU S., PINNER M.S. **Pesticide Sciences** 42:123-128, 1994.
3. BELLOTI A., SCHOONHOVEN V.A. Plagas de la yuca y su control. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Serie 09SC-2. p. 73, 1978.
4. BOCK K.R. **Abstract of the 1981 International Workshop on Pathogens Transmitted by whiteflies**. Oxford, England. Association of Applied Biologist. Wellesbourne. p. 44, 1981.
5. DEBROT E., HEROLD F., DAO F. **Agro-nomía Tropical** 13:33-41, 1963.
6. DEBROT E.A., ORDOSGOITTI A. **Agro-nomía Tropical** 25(5): 435-449, 1978.
7. DUFFUS E.J., FLOCK A.R. **California Agriculture** 36(11-12): 4-6, 1982.
8. MARAMOROSCH K., MUNIYAPPA V. Whitefly transmitted plant disease agent in Karnataka, India. In **Abstract of the 1981 International Workshop of Pathogens Transmitted by Whiteflies**. Oxford, England. Association of Applied Biologists. Wellesbourne. p. 61-63, 1981.
9. MUNIYAPPA V., SWANSON M.M., DUNCAN G.H., HARRISON B.D. **Annals of Applied Biology** 118:595-604, 1991
10. ARNAL E., RAMOS F.Y., DEBROT E. **Agro-nomía Tropical** 43: 267-285, 1993b.
11. ARNAL E. Estudio de algunos aspectos morfológicos y ecológicos de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Tesis de Maestría), Universidad Central de Venezuela, Maracay (Venezuela), 1985.
12. BYRNE F.J., DEVONSHIRE A.L. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 45:34-42, 1993.

13. BROWN J.K., BIRD J. *Plant Disease* 76:220-225, 1992.
14. COHEN S., NITZANY F.E. *Phytopathology* 56:1127-1131, 1966.
15. MACINTOSCH S., ROBINSON D.J., HARRISON B.D. *Annals of Applied Biology* 121:297-303, 1992.
16. BEDFORD I.D., BRIDDON R.W., JONES P., ALKAFF N.P.G., MARKHAM P.G. *Eur J Plant Pathology* 100(3-4): 243-258, 1994.
17. ROCHESTER D.E., KSITRANANA W., BEACHY R.N. *Virology* 178:520-526, 1990.
18. DRY I.B., RIGDEN J.E., KRAKE L.R. MILLINEAUX P.M., REZAIAN M.A. *Journal of General Virology* 74:147-151, 1993.
19. BOCK K.R., GUTHRIE E., MEREDITH G. *Annals of Applied Biology* 90:361-367, 1978.
20. MATTEW A.V., MUNIYAPPA V. *Journal of Phytopathology* 135:299-308, 1992.
21. MANSOOR S., BEDFORD I., PINNER M., STANLEY J., MARKHAM P.G. *Pak J Bot* 25(1):105-107, 1993.
22. NOUR M.A., NOUR J.J. Leaf curl viruses in the Sudan. The Empire Cotton Growing Review. 41:27-37, 1964.
23. BROWN J.K., NELSON M.R. *Plant Disease* 71:522-524, 1987.
24. FRANKE G., VAN BALEN L., DEBROT E.A. *Revista de la Facultad de Agronomía* 6(2): 741-743, 1983.
25. BIRD J.V. A whitefly transmitted mosaic of gossypifolia. Tech. Paper Agric. Exp. Station. 22, 35, 1957.
26. BIRD J.V., MARAMOROSCH K. *Adv Virus Res* 22: 55-110, 1978.
27. COSTA A.S., RUSSELL L.M. *Ciencia e Cultura* 27: 388-390, 1975.
28. BROWN J.R. *Las moscas blancas (Homoptera:aleroydidae) en América Central y el Caribe*. L. Hilje y O. Arboleda Editores. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p. 1-9, 1993.
29. CABALLERO R. Importancia de la identificación de biotipos de *Bemisia tabaci* (genadius) en Centroamérica. En: **2do. Taller Centroamericano y del Caribe sobre moscas blancas. Resumen**. Nicaragua 19-22 de Octubre. Comisión Nacional de Mosca Blanca. p. 1, 1993.
30. BELLOWS J.S., PERRING T M., GILL R.J., HEADRICK D.H. *Ann of Entomological Society of America* 87(2): 195-206, 1994.
31. ARNAL E., RUSSELL L., DEBROT E., RAMOS F., CERMELI M.D., MARCANO R., MONTAGNE A. *Florida Entomologist* 76(2):365-381, 1993a.
32. GOODMAN R.M. *Journal of General Virology* 54:9-21, 1981.
33. HAMILTON W.D.O., SANDERS R.C., COUTTS R.H.A., BUCK K.W. *FEMS Microbiology Letters* 11:263-267, 1981.
34. HARRISON B.D. *Ann Rev Phytopathol* 23:55-82, 1985.
35. HOWARTH A.J., GOODMAN R.M. *Trends in Biochemical Sciences* 7:180-182, 1982.
36. LAZAROWITZ S.G. *Critical Reviews in Plant Science* 11:327-349, 1992.
37. MATTEWS R.E.F. *Intervirolgy* 17:11-76, 1982.
38. STANLEY J. *Advances in Virus Research* 30:139-177, 1985.
39. STANLEY J. *Sem Virol* 2:139-150, 1991.
40. FRANCKI R.B.I., FAUQUET C.M., KNUDSON D.L., BROWN F. Classification and nomenclature of viruses. **Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Archives of Virology, Supplementum 2, 1991.
41. ROBERTS I.M., ROBINSON D.J., HARRISON B.D. *Journal of General Virology* 65:1723-1730, 1984.
42. BRIDDON R.W., PINNER M.S., STANLEY J., MARKHAM P.G. *Virology* 177:85-94, 1990.
43. HARRISON B.D., SWANSON M.M., McGRATH P.F., FARGETTE D. Patterns of antigenic variation in whitefly-transmitted

- geminiviruses. Report of Scottish Crop Research Institute for 1990, pp. 88-90, 1991a.
44. PADIDAM M., BEACHY R.N., FAUQUET C.M. *Journal of General Virology* 76:25-35, 1995.
 45. SWANSON M.M., BROWN J.K., POULOS B.T., HARRISON B.D. *Annals of Applied Biology* 121:285-296, 1992.
 46. THOMAS J.E., MASSALSKI P.R., HARRISON B.D. *Journal of General Virology* 67:2739-2748, 1986.
 47. MCGRATH P.F., HARRISON B.D. *Annals of Applied Biology* 126:307-316, 1995.
 48. BEDFORD I.D., BRIDDON R.W., MARKHAM P.G., BROWN J.K., ROSSELL R.C. *Bemisia tabaci* - biotype characterisation and threat of this whitefly species to agriculture. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference- Pests and Diseases*. pp. 1235-1240, 1992.
 49. BEDFORD I.D., BRIDDON R.W., MARKHAM P.G., BROWN J.K., ROSSELL R.C. A new species of *Bemisia* or biotype of *Bemisia tabaci* (Genn.) as a future pest to European agriculture. Plant Health and the European Single Market. Ed. D.L. Ebbels BCPC Monograph N° 54. pp. 381-386, 1993.
 50. MATTEWS R.E.F. *A Critical Appraisal of Viral Taxonomy*, Edited by R. E. F. Matthews. Boca Raton: CRC Press, pp. 1-35, 1983.
 51. COHEN J., FRANCK S., VETTEN H.J., LESEMANN D.E., LOEBENSTEIN G. *Annals of Applied Biology* 121:257-268, 1992.
 52. GILBERTSON R.L., HIDAYAT S.H., MARTÍNEZ R.T., LEONG S.A., FARIA J.C., MORALES F., MAXWELL D.P. *Plant Disease* 75(4):336-342, 1991.
 53. HOLLINGS M., STONE O.M., BOCK R. *Annals of Applied Biology* 82:511-528, 1976.
 54. LARSEN R.C., KIM K.S., SCOTT H.A. *Phytopathology* 81(2):227-232, 1991.
 55. SELA I., ASSOULINE I., TANNE E., COHEN S., MARCO S. *Phytopathology* 70(3):226-228, 1980.
 56. TAN P.H.N., WONG M. *Journal of Phytopathology* 139:165-176, 1993.
 57. FRANCKI R.I.B. *A Critical Appraisal of Viral taxonomy*, Edited by R. E. F. Matthews. Boca Raton. CRC Press, pp. 63-104, 1983.
 58. FAUQUET C., DEJARDIN J., THOUVENEL J.C. *Intervirology* 25:1-3, 1986.
 59. SHUKLA D.D., WARD C.W. *Journal of General Virology* 69:2703-2710, 1988.
 60. MASSALSKI P.R., HARRISON B.D. *Journal of General Virology* 68:1813-1821, 1987.
 61. SEQUEIRA J.C., HARRISON B.D. *Annals of Applied Biology* 101:33-42, 1982.
 62. COHEN S., DUFFUS J.E., LARSEN R.C., LIU H., FLOCK R.A. *Phytopathology*. 73: 1669-1673, 1983.
 63. LINDSTEN K. *Växtskyddsnotiser* 44:54-59, 1980.
 64. MUMFORD D.L. *Plant Disease* 66:940-941, 1982.
 65. MUNIYAPPA V.K.F. *Vectors of Plant Pathogens*. Harris and M. Maramorosch Editors, Academic Press, New York (USA), p. 467, 1980.
 66. POLSTON J.E., DODDS J.A., PERRING T.M. *Phytopathology* 79(10):1123-1127, 1989.
 67. WEIDEMANN H.L. *Potato Research* 31:485-492, 1988.
 68. VAN REGENMORTEL M.H.V. *Serology and Immunochemistry of plant viruses*, Academic Press, pp. 287, 1982.
 69. ROBINSON D. J., HARRISON B.D., SEQUEIRA J.C., DUNCAN G.H. Detection of strains of African cassava mosaic virus by nucleic acid hybridisation and some effects of temperature among geminiviruses. *Annals of Applied Biology*. 105:483-493, 1984.
 70. HARRISON B.D., MUNIYAPPA V., SWANSON M.M., ROBERTS I.M., ROBINSON D.J. *Annals of Applied Biology* 118:299-308, 1991b.

71. JORDE L.B., CAREY J.C., WHITE R.L. **Genética Médica**, Mosby/Doyma Libros, S. A. Madrid (España), pp. 42-55, 1996.
72. HABER S., POLSTON J.E., BIRD J. **Can J Plant Pathol** 9:156-161, 1987.
73. ROJAS M.R., GILBERTSON R.L., RUSSELL D.R., MAXWELL D.P. **Plant Disease** 77(4):340-347, 1993.
74. ABOUZID A.M., POLSTON J.E., HIEBERT E. **Journal of General Virology**. 73:3225-3229, 1992.
75. COUTTS R.H.A., COFFIN R.S., ROBERTS E.J.F., HAMILTON W.D.O. **Journal of General Virology** 72:1515-1520, 1991.
76. FARIA J.C., GILBERTSON R.L., HANSON S.F., MORALES F.J., AHLQUIST P., LONIELLO A.O., MAXWELL D.P. **Phytopathology** 84:321-329, 1994.
77. GILBERTSON R.L., FARIA J.C., AHLQUIST P., MAXWELL D.P. **Molecular Plant Pathology** 83(7):709-715, 1993.
78. HAMILTON W.D.O., STEIN V.E., COUTTS R.H.A., BUCK K.W. **The EMBO Journal** 3(9):2197-2205, 1984.
79. HIDAYAT S.H., GILBERTSON R.L., HANSON S.F., MORALES F.J., AHLQUIST P., RUSSELL D.R., MAXWELL D.P. **Molecular Plant Pathology** 83(2):181-187, 1993.
80. HONG Y.G., ROBINSON D.J., HARRISON B.D. **Journal of General Virology** 74:2437-2443, 1993.
81. HOWARTH A.J. CATON J., BOSSERT M., GOODMAN R.M. Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 82:3572-3576, 1985.
82. KHEYR-POUR A., BENDAHMANE N., MATZEIT V., ACCOTTO A.P., CRESPI S., GRONENBORN B. **Nucleic Acids Research** 19(24):6763-6769, 1991.
83. LAZAROWITZ S.G., LAZDINS I.B. **Virology** 180:58-69, 1991.
84. MORINAGA T., IKEGAMI M., MIURA K.I. **Molecular Immunology** 37:471-476, 1993.
85. MORRIS B., COATES L., LOWE S., RICHARDSON K., EDDY P. **Nucleic Acids Research** 18:197-198, 1990.
86. NAVOT N., PICHESKY E., ZEIDAN M., ZAMIR D., CZOSNEK H. **Virology** 185:151-161, 1991.
87. STANLEY J., GAY M.R. **Nature** 301:260-262, 1983.
88. STANLEY J., MARKHAM P.G., CALLIS R.J., PINNER M.S. **The EMBO Journal** 5(8):1761-1767, 1986.
89. TAN P.H.N., WONG S.M., WU M., BEDFORD I. D., SAUNDERS K., STANLEY J. **Journal of General Virology** 76:2915-2922, 1995.
90. TORRES I., GARZÓN J.A., HERRERA L., RIVERA R.F. **Journal of General Virology** 74:2225-2231, 1993.
91. GILBERTSON R.L., ROJAS M.R., RUSSELL D.R., MAXWELL D.P. **Virology** 72:2843-2848, 1991.
92. LANGEVELD S.A., DORE J.M., MEMELINK J., DERKS A.F.M.L., VAN DER VLUGH C.I.M., ASJES C.J., BOL J.F. **Journal of General Virology** 72:1531-1541, 1991.
93. NAKHLA M.K., ROJAS M.R., McLAULGH-LIN W., WYMAN J., MAXWELL D.P. **Plant Disease** 76(5):538, 1992.
94. NAVOT N., ZEIDAN M., PICHESKY E., ZAMIR D., CZOSNEK H. **Molecular Plant Pathology** 82(10):1199-1202, 1992.
95. NICKOLAI M.P., UZCÁTEGUI R.C., INFANTE D. **Plant Disease** 79(6):590-594, 1995.
96. ROBERTSON N.L., FRENCH R., GRAY S. M. **Journal of General Virology** 72:1473-1477, 1991.
97. RYBICKI E.P., HUGHES F.L. **Journal of General Virology** 71:2519-2526, 1990.
98. VUNSH R., BOSNER A., STEIN A. **Annals of Applied Biology** 117:561-569, 1990.
99. INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.T. **PCR protocols. A Guide of Methods and Applications**, Academic Press, New York (USA), pp. 482, 1990.

-
100. SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. **Science** 239:487-491, 1988.
 101. HAYES R.J., BUCK K.W. **Journal of General Virology** 71:2519-2526, 1990.
 102. FREISCHMUTH T., ZIMMAT G., JESKE H. **Virology** 178:461-467, 1990.
 103. VON ARNIM A., STANLEY J. **Virology** 186:286-293, 1992.
 104. ZEIDAN M., CZOSNEK H. **Journal of General Virology** 72:2607-2614, 1991.
 105. PUCHTA H., SANGER H.L. **Archives of Virology** 106:335-340, 1989.
 106. WILSON T.M.A., DAVIES J.W. **Outlook on Agriculture** 23:33-39, 1994.
 107. BUCK K.W., COUTTS R.H.A. **Plant Molecular Biology** 2:351-354, 1983.