

NOTA TECNICA

IDENTIFICACION DE VIRUS EN EL TOMATE (*Lycopersicum sculentum* L.) EN CINCO DEPARTAMENTOS DE GUATEMALA¹

Danilo Dardón², Felipe Calderón² Víctor Salguero³, Ramón Lastra³, Judith Brown⁴

RESUMEN

Identificación de virus en el tomate (*Lycopersicum sculentum* L.) en cinco departamentos de Guatemala. Con el objetivo de determinar o no la presencia en el tomate de algunos virus en la enfermedad denominada "acoloamiento" del tomate y si son o no transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius), se realizó un muestreo en los departamentos de Zacapa, Jutiapa, Jalapa, Chimaltenango y Guatemala. Se detectó la presencia de seis virus: TMV, CMV, TEV, PVY, PVX y TSWV; y dos geminivirus CdTV y SCLV. La presencia de una sola muestra positiva para TSWV, es dudosa y es necesario reconfirmar o no su presencia en Guatemala, porque hasta el momento no había sido informado en el país. Así mismo, los geminivirus en el tomate, no se tenían informes en Guatemala, de su presencia, caso del Virus Chino del tomate (VCdT) y del Virus del enrollamiento de la hoja del Ayote (SCLV). Así mismo se concluyó que en "el acoloamiento" del tomate, están asociados virus diferentes y que son la causa de la diversidad de síntomas de esta enfermedad.

ABSTRACT

Virus identification in tomato (*Lycopersicum sculentum* L.) in five Departments of Guatemala. A sampling was conducted at the Departments of Zacapa, Jutiapa, Jalapa, Chimaltenango and Guatemala, to determine the presence of the tomato viruses causing the disease known as "Curly Top" and if they are transmitted by the "white fly" (*Bemisia tabaci* Gennadius), the presence of six virus: TMV, CMV, TEV, PVY, PVX and TSWV, and two geminivirus CdTV and SCLV was detected. The finding of a single TSWV positive sample makes it necessary to reconfirm its presence in Guatemala because it had not been reported before. Likewise, the geminivirus in tomato had not been reported in Guatemala, as well as the Chinese Virus of Tomato (VCdT) and the Squash Curly Leaf Virus (SCLV). It was concluded that different viruses are associated to the "Curly Top" disease in tomato and that they cause a diversity of symptoms.

INTRODUCCION

El tomate es una hortaliza presente en la dieta de la población Guatemalteca. Su cultivo se ha generalizado en las diferentes condiciones y regiones del país. Sin embargo, desde 1987, apareció una enfermedad que popularmente los productores denominan "acoloamiento" del tomate. Esta enfermedad fue relacionada con geminivirus debido a los síntomas y a las altas poblaciones del insecto vector mosca blanca

(*Bemisia tabaci*). Además de los geminivirus, existen otros virus no transmitidos por *B. tabaci*, que están presentes en los tomates que se cultivan en Guatemala y el resto del mundo. Para implementar medidas preventivas contra enfermedades virales, es necesaria su identificación y con ello, establecer su forma de transmisión. Esto permite conocer cuáles especies vectoras podrían estar involucradas, en el acoloamiento del tomate.

¹ Presentado en la XXXIX Reunión Anual del PCCMCA en Guatemala, C. A., 1993.

² Disciplina de Protección Vegetal, ICTA, Guatemala,

³ CATIE-RENARM-MIP, Guatemala y Costa Rica, respectivamente,

⁴ Universidad de Arizona, Estados Unidos,

Con estos antecedentes, y con la idea que en el cultivo del tomate es normal encontrar uno o varios virus asociados y que afectan simultáneamente, se planificó en el proyecto "MIP" ICTA/CATIE, un estudio para determinar la presencia o ausencia de geminivirus (transmitidos por *B. tabaci*) y algunos virus no transmitidos por *B. tabaci*.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio constó de dos fases: a) campo, b) laboratorio. La fase de campo consistió en la recolección de muestras foliares en plantaciones comerciales de tomate ubicadas en los departamentos de Zacapa, Jalapa, Jutiapa, Chimaltenango y Guatemala. Cada muestra se obtuvo individualmente, de plantas de tomate que presentaban algún (os) síntoma (s) de la enfermedad denominada "acoloramiento" del tomate. Cada muestra consistió de uno a tres folíolos jóvenes, de las plantas enfermas. Para evitar su deshidratación y preservarla mejor, cada muestra se colocó en una bolsa plástica transparente, previamente identificada por lugar y síntomas que presentaba la planta. Seguidamente, se llevó a una hielera portátil para bajarle la temperatura a aproximadamente a unos 45°C y, en estas condiciones se llevó al laboratorio para proceder a su análisis. La recolección de muestras se hizo del 6 al 9 de abril de 1992.

La fase de laboratorio se realizó en las Universidades del Valle en Guatemala y en la de Arizona, Estados Unidos. En la Universidad del Valle se evaluaron la presencia de los virus no transmitidos por mosca blanca y en la Universidad de Arizona, la de los geminivirus, transmitidos por este insecto.

A. Virus no transmitido por *Bemisia tabaci* Genn.

La técnica para los virus no Gemini fue "ELISA" doble "sandwich" de anticuerpos (DAS), indicada por J.M. Sánchez Vizcaíno y M. Cambra Alvarez (2).

Las iniciales en inglés y los nombres usuales con los que se conocen, así como la traducción libre se presenta en los Cuadros 1 y 2 para estos virus es la siguiente:

Preparación de las muestras

1. Se procedió a la extracción del antígeno del tejido vegetal por medio de su maceración y trituración por un mortero y a esto se le agregaba una solución amortiguadora (tampón), hasta obtener aproximadamente una dilución del jugo vegetal obtenido en 3040 ml de la solución tampón.

Solución tampón utilizada: PBS (pH 7.2)

CINa.	8,0 g
P04H2K	0,2 g
P04HNa2Hp	2,9 g
CIK	0,2 g
N3Na.	0,2 g
Agua destilada	1000,0 ml

La prueba de ELISA se realizó en los laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala, el día 10 de abril de 1992. La prueba de ELISA realizada se describe a continuación.

Tamizado

- a. Se añadió 0,2 ml por pocillo del antígeno en tampón carbonato pH 9,6.
- b. Se incubó con la placa tapada durante dos horas a 40°C.
- c. Se lavó con tampón lavador o PBS- Tween.
- d. Se conservó las placas sensibilizadas y secas a temperatura ambiente durante cuatro horas.

Adición de la muestra

- a. Se añadió 0,1 ml por pocillo del suero objeto de estudio previamente diluido en PBS.
- b. Se incubó durante una hora a 37°C.
- c. Se lavaron con tampón lavador o PBS para arrastrar las inmunoglobulinas no fijadas. Se lavaron tres veces, a intervalos de cinco minutos entre lavado y lavado.

Cuadro 1 Virus no transmitidos por mosca blanca evaluados para su identificación en el cultivo de tomate en Guatemala.

INGLES		ESPAÑOL
CMV	cucumber mosaic virus	Virus del mosaico del pepino
TSWV	tomato spotted wilt virus	Virus de la marchitez manchada del tomate.
TbMV	tobacco mosaic virus	Virus del mosaico del tabaco.
PVX	potato virus x	Virus "x" de la papa.
PVY	potato virus Y	Virus "y" de la papa.
TbEV	tobacco virus ETCH	Virus ETCH del tabaco.

Cuadro 2 Virus transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.), evaluados para su identificación en el cultivo de tomate en Guatemala.

INGLES		ESPAÑOL
SCLV	squash curl leaf virus	Virus del encrespamiento de la hoja del ayote
CdTV	Chino del tomate virus	Virus Chino del tomate
BMGV	bean mosaic golden virus	Virus mosaico dorado frijol
pr	tipe Puerto Rican	tipo Puerto Rico
fl	tipe Florida	tipo Florida
TGMV	tomato golden mosaic virus	Virus mosaico dorado tomate
AbMV	abutilon mosaic virus	virus mosaico del abutilon
ACMV	african cassava mosaic virus	virus del mosaico de la yuca
TYLCV	tomato yellow curl leaf virus	virus del encrespamiento amarillo del tomate
ICMV	ippsilon curl mosaic virus	virus mosaico encrespamiento del ipsilon

d. Se secó el excedente en los bordes de la placa con toalla de papel.

Adición del conjugado

- Se añadió 0,1 ml del conjugado antiespecie o proteína "A" marcada con peroxidasa a la dilución de trabajo óptima.
- Se incubó durante cinco horas a 37°C.
- Se lavó con PBS o tampón de lavado para arrastrar el conjugado no fijado. En forma similar a Fase II, se llevó tres veces.

d. Se secó el excedente en los bordes de la placa con toalla de papel.

Revelado de la reacción y lectura

- Se añadió 0,1 ml de la mezcla de sustrato.
- Se incubó durante cinco a seis minutos a temperatura ambiente.
- Se paralizó la reacción mediante la adición de 0,1 ml de S04H23N.
- Se realizó la lectura visual para el sustrato. La intensidad de color será proporcional al contenido de anticuerpos.

B. Análisis para GEMINIVIRUS los cuáles si son transmitidos por *Bemisia tabaci* Genn.

Para su análisis, se prepararon las 21 muestras (de un total de 51) según metodología (comunicación personal de la Dra. Judith Brown), y las pruebas se realizaron entre el 22 de agosto al 1 de septiembre de 1992.

Metodología para geminivirus

- 1- Se hicieron las preparaciones de las muestras, las cuáles fueron secadas en silica gel. Posteriormente antes de todo el proceso de someter las muestras a los reactivos, se hicieron y se cortaron las membranas sulfonadas.
- 2- Ya completamente secas las muestras, se les agregó 0,1g de carborundum, más un ml de la solución de NaEB.
- 3- Luego se pasaron a una centrífuga a 1000 rpm durante cinco minutos. Se le agregaron 3ml de uD en una disolución 1:50. Es importante indicar que para obtener la dilución 1:50 se forma con 5ml de solución uD en 147ml de NaEB.
- 4- Posteriormente se le agregaron 3ml de una solución 3N de NaOH y se dejó reposar durante 10 minutos. Seguidamente se les adicionó 9ml de una solución 3M de NaAl con pH de 5,2 que se mezcló con 3ml de solución Dob. Se dejó secar al ambiente.
- 5- La lectura de la reacción, se realizó a los 10 días, pero previamente se hizo un lavado final con 42 cc de una solución Hgf y luego se dejó por 30 minutos en reposo con 48 cc de esta misma solución en una proporción 0,1: 55.

RESULTADOS

A. Virus no transmitidos por mosca blanca

Se obtuvieron cincuenta y una muestras para el análisis de los virus no Gemini, se utilizó la técnica de "ELISA". En el Cuadro 3, se presenta la identificación y sintomatología de las muestras recolectadas y los virus detectados en los cinco departamentos de Guatemala, que

se incluyeron en el presente estudio. En el Cuadro 4, se muestra un resumen y la frecuencia con que se detecto cada virus expresado en el número de muestras y en porcentajes (%).

B. Geminivirus (transmitidos por mosca blanca).

Se obtuvieron 21 de las 51 muestras iniciales para el análisis de los geminivirus, por medio de la técnica de hibridaciones. En el Cuadro 5, se observa la identificación y sintomatología de las muestras recolectadas y los geminivirus detectados en los cinco departamentos de Guatemala, que se incluyeron en el presente estudio. En el Cuadro 6, puede verse un resumen y la frecuencia con que se detectaron los geminivirus expresado en el número de muestras y en porcentajes (%).

DISCUSION

Del Cuadro 3, lo que puede indicarse es que la sintomatología de la enfermedad "acolochamiento" del tomate, varía de muestra a muestra y también a nivel de cada departamento. Esto podría indicar que por la compleja relación existente entre los virus, el hospedero, el vector, las fuentes de virus y el ambiente, no se tiene una sintomatología típica para identificar la enfermedad en el campo. Además, la variabilidad de síntomas parece indicar que no sólo es debido al problema de los virus sino que podrían existir otros factores no considerados en este estudio. Entre los que podrían estar: problemas de fertilidad de los suelos; falta o exceso de agua; salinidad; hongos y bacterias del suelo; nematodos y otras enfermedades.

También, algunos de los síntomas observados en el campo, en el 90% de los casos, son similares a los ocasionados por los virus conocidos como geminivirus cuyo vector principal es la mosca blanca (*B. tabaci*). Los geminivirus para ser detectados requieren de otras técnicas, por las cuáles no se analizaron las 51 muestras, debido a lo oneroso que resulta cada análisis. Por esa razón sólo 21 muestras fueron enviadas a la doctora Julie Brown, especialista en geminivirus de tomate, de la

Cuadro 3 Localidades, sintomatología del “acoloramiento” y virus identificados en las muestras foliares recolectadas en cinco departamentos de Guatemala abril 1992.

Nº .	MUESTRA	LOCALIDAD	SINTOMAS DE LA PLANTA (en el follaje)	VIRUS
1	ICTA El Oasis	Zacapa	Mosaico amarillo-encrespamiento	ND
2	" " " "	Zacapa	Enrollamiento-bandeado en nervaduras.	PVY
3	" " " "	Zacapa	Mosaico amarillo-arrugado de hojas	TbEV-CMV
4	" " " "	Zacapa	Enrollamiento-rugosidad-enanismo.	ND
5	" " " "	Zacapa	Enrollamiento	ND
6	" " " "	Zacapa	Cordón de zapato.	TMV
7	" " " "	Zacapa	Acoloramiento amarillamiento.	ND
8	" " " "	Zacapa	Acoloramiento-arbolito.	CMV
9	" " " "	Zacapa	Acoloramiento-hojas pequeñas- enrollado al revés.	ND
10	" " " "	Zacapa	Achaparramiento.	CMV-TMV
11	" " " "	Zacapa	Cordón de zapato.	ND
12	" " " "	Zacapa	Amarillamiento-mosaico cálico.	ND
13	" " " "	Zacapa	Enrollamiento.	ND
14	" " " "	Zacapa	Acoloramiento-achaparramiento.	ND
15	" " " "	Zacapa	Acoloramiento.	CMV
16	ICTA El Oasis	Zacapa	Acoloramiento achaparramiento.	TbEV-CMV
17	Escuela Monjas	Jalapa	Acolorado verde	TMV
18	Escuela Monjas La Campana Monjas	Jalapa	No describieron síntomas.	ND
19	J. Sandoval Monjas	Jalapa	No describieron síntomas.	ND
20	Escuela Monjas	Jalapa	No describieron síntomas.	ND
21	Distrito de riego	Jalapa	No describieron síntomas.	TMV-TbEV
22	La Campana Monjas	Jalapa	No describieron síntomas.	CMV-PVX
23	D.R. La campana	Jalapa	No describieron síntomas.	PVX
24	D.R. La campana	Jalapa	No describieron síntomas.	TMV
25	D.R. La campana	Jalapa	No describieron síntomas.	ND
26	W.Salguero Retana	Jutiapa	No describieron síntomas.	CMV-TbEV
TMV		El Progreso		PVX PVY
27	" " " " " "	Jutiapa	No describieron síntomas.	ND
28	" " " " " "	Jutiapa	No describieron síntomas.	CMV-TbEV
TMV				PVX PVY
29	W.Salguero Retana El Progreso	Jutiapa	Amarillento, calico	ND
30	F.Ruano P.Retana El Progreso	Jutiapa	No describieron síntomas.	ND
31	F.Ruano P.Retana El Progreso	Jutiapa	No describieron síntomas.	ND
32	P.Esquivel Retana El Progreso	Jutiapa	No describieron síntomas.	ND
33	P.Esquivel Retana El Progreso	Jutiapa	No describieron síntomas.	CMV-TbEV PVX-TMV

Continuación Cuadro 3

Nº.	MUESTRA	LOCALIDAD	SINTOMAS DE LA PLANTA (en el follaje)	VIRUS
34	Los Arriaza Retana El Progreso	Jutiapa	Presenta buena carga	ND
35	Los Arriaza Retana El Progreso	Jutiapa	No describieron síntomas.	PVY
36	J.Tubac, Alameda Chimalt.	Chimalt.	Enanismo, mosaico	ND
37	" " " " " " " "	Chimalt.	Acolochamiento	ND
38	" " " " " " " "	Chimalt.	Rugosidad follaje	ND
39	" " " " " " " "	Chimalt.	Mosaico	ND
40	J.Tubac, Alameda Chimalt.	Chimalt.	Mosaico leve	TMV
41	S. López, La Alameda, Chimalt.	Chimalt.	Rugosidad	ND
42	" " " " " " " "	Chimalt.	Acolochamiento	ND
43	" " " " " " " "	Chimalt.	Mosaico-acolochamiento	CMV-TbEV- PVX-PVY-TMV
44	" " " " " " " "	Chimalt.	Punta morada acolo. enanis	TSWV
45	" " " " " " " "	Guate.	P. morada acolo. enanis	PVY
46	S. López, La Alameda, Chimalt.	Guate.	Mosaico Amarillo calico	ND
47	F. Viteri El Morlón Amatitlán	Guate.	Acolochamiento	ND
48	" " " " " " " "	Guate.	Apariencia sana	ND
49	" " " " " " " "	Guate.	Enanis.deforma.hojas b.	ND
50	" " " " " " " "	Guate.	Acolo. deforma.hojas b.	ND
51	F. Viteri El Morlón Amatitlán		Mosaico	ND

Cuadro 4 Número de muestras por localidad y departamento y virus no transmitido por mosca blanca detectado en algunas muestras.

LOCALIDAD	DEPARTAMENTO	No. DE MUESTRA	VIRUS
ICTA, El Oasis	Zacapa	16	1 PVY 1 TbEV 2 TMV 4 CMV
Monjas	Jalapa	9	2 TbEV 2 CMV 3 TMV
Retana, El Progreso	Jutiapa	10	3 CMV 3 TbEV 3 TMV 3 PVX 3 PVY
La Alameda	Chimaltenango	11	1 TMV 1 CMV 1 PVX 2 PVY 1 TbEV 1 TSWV*
El Morlón Amatitlán	Guatemala	05	No se detectaron estos virus

* dudoso, respuesta muy leve.

Cuadro 5. Porcentajes de incidencias de los virus en las plantas de tomate.

	Virus	Plantas con virus	
		Número	Porcentaje
07 presentaron	TbEV	7	13,72
10 presentaron	CMV	10	19,60
05 presentaron	PVX	5	9,80
08 presentaron	PVY	8	15,69
10 presentaron	TMV	10	19,60
01 presentó	TSMV	1	1,96

Cuadro 6 Localidades, sintomatología del "acolochamiento" y Geminivirus identificados en las muestras foliares recolectadas en cinco departamentos de Guatemala en abril de 1992.

Nº	MUESTRA	LOCALIDAD	SINTOMAS DE LA PLANTA (en el follaje)	VIRUS
1	ICTA El Oasis	Zacapa	Mosaico amarillo-enrollamiento.	Mezcla- SLCV
3	" " " "	Zacapa	Mosaico amarillo-arrugado de hojas	Mezcla-
4	" " " "	Zacapa	Enrollamiento-rugosidad-enanismo.	SLCV-CdTV
9	" " " "	Zacapa	Acolochamiento-hojas pequeñas- enrollado al revés	Mezcla- SLCV-CdTV
12	" " " "	Zacapa	Amarillamiento-mosaico cálico.	Mezcla- SLCV-CdTV
15	ICTA El Oasis	Zacapa	Acolochamiento.	Mezcla SLCV-CdTV
18	Escuela Monjas	Jalapa	No describieron síntomas.	Mezcla- SLCV
21	Escuela Monjas	Jalapa	No describieron síntomas.	Mezcla- SLCV
25	Distrito de Riego La Campana Monjas	Jalapa	No describieron síntomas.	Mezcla- SLCV

Universidad de Arizona, Estados Unidos, los resultados se presentan en los Cuadros 5 y 6.

En el Cuadro 4, se observa que todos los virus objeto de este estudio, fueron detectados en alguno de los departamentos del país. La excepción fue el virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), que aunque si hubo una muestra positiva es necesario su reconfirmación posterior, porque este virus no ha sido reportado en Guatemala. En un trabajo de Jones et al (1991), se indica que todos estos virus son de transmisión mecánica, por lo que deben manejarse preventivamente. Además, se indica que cuatro de estos virus (CMV - PVX-PVY - TbEV), son transmitidos principalmente por áfidos como *Mysus persicae*.

En el Cuadro 5, puede observarse que la sintomatología en las muestras, no esta bien definida y

que la presencia de algunos geminivirus, que fueron objeto de este estudio, complica la definición de los síntomas característicos de la enfermedad denominada "acolochamiento" del tomate. Brown indicó por primera vez al CdTV, en SINALOA, MEXICO, y su vector para su transmisión es *B. tabaci*. Indica que SLCV, es también transmitido por la mosca blanca *B. tabaci*. Así también, se determinó que alguno de los geminivirus colocados en la mezcla de estos virus (denominada enfermedad del tigre), también estuvo presente en las muestras analizadas

CONCLUSIONES

1. La sintomatología de la enfermedad denominada "acolochamiento" del tomate, es variable y por lo tanto, no se tienen síntomas típicos.

2. Que asociados a los virus pueden existir otros factores no determinados aún, que contribuyen a aumentar y magnificar el problema del "acolocamiento" del tomate.
3. Se detectó la presencia de seis de los virus objeto de este estudio aunque queda pendiente la confirmación de TSWV.
4. En el virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), solo hubo una muestra positiva, lo que deja duda sobre su existencia en el país.
5. Se encontró la presencia de dos geminivirus y una mezcla de los mismos.

LITERATURA CITADA

- JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITEER T. A. 1991. Compendium of tomato diseases. APS Press The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota 55121, USA 71 p.
- SANCHEZ-VIZCAINO, J. M.; CAMBARA ALVAREZ, M., 1987. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. Serie técnica No, 7, segunda edición; Office International Des Epizooties, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, 12, Ruz de Prony, 75018, Paris, Francia 62 p.