

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**



**“MODELO DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS DEL  
AMARILLAMIENTO DE LAS VENAS DE LA PAPA (PYVV)  
POR *Trialeurodes vaporariorum* (WESTWOOD)”**

**Presentada por:**

**LUIS ALEJANDRO CUMAPA CUELLO**

**Tesis para optar el Título de:**

**INGENIERO AGRONOMO**

**Lima – Perú**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**

**“Modelo de transmisión del Virus del amarillamiento de las venas de la papa (PYVV) por *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)”**

Presentado por:

**LUIS ALEJANDRO CUMAPA CUELLO**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE:

**INGENIERO AGRONOMO**

**Sustentada y Aprobada ante el siguiente jurado:**

---

ING. AGR. M.S. Cesar, Fribourg Solis

**PRESIDENTE**

---

Dr. Alexander, Rodríguez Berrio

**ASESOR**

---

ING. AGR. Mg.Sc. Carlos, Cadenas Giraldo

**MIEMBRO**

---

ING. AGR. M.S. Germán, Joyo Coronado

**MIEMBRO**

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco al Centro Internacional de la Papa (CIP) por el financiamiento otorgado para la realización de mi tesis. En especial, al Doctor Jan Kreuze por su apoyo y sugerencias para la realización del proyecto.*

*Un especial agradecimiento a la que fue mi asesora del proyecto Heidi Gamarra por su apoyo en todo momento durante el desarrollo del proyecto y su aliento constante en la culminación de la misma.*

*También agradezco a mis padres Luis Alejandro Cumapa y Catalina Cuello, quienes estuvieron apoyándome siempre a seguir adelante tanto en los momentos buenos y malos y que siempre confiaron en mí.*

*Un agradecimiento también a una persona muy especial en mi vida, Samy Hermenegildo, quien estuvo en todo momento brindándome su apoyo para lograr la meta.*

*A mis compañeros del CIP, Ana Pérez, Joao de Souza, Dina Gutierrez, Segundo Fuentes quienes fueron de gran ayuda con sus consejos y apoyo durante las diferentes etapas del proyecto.*

*A mi asesor Alexander Rodríguez y miembros de Jurado, Cesar Fribourg, Carlos Cadenas y German Joyo por sus consejos y aportes para la culminación del trabajo.*

*Y finalmente a todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron en el desarrollo de este importante trabajo.*

# INDICE

	<b>Pag.</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISION DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1. La mosca blanca de los invernaderos <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood)	3
2.1.1. Clasificación	3
2.1.2. Biología de la mosca blanca <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	3
2.1.3. Comportamiento poblacional de <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	8
2.1.4. Daños ocasionados por <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	9
2.2. Virus del amarillamiento de las venas de la papa o “ <i>Potato yellow vein virus</i> ” (PYVV)	11
2.2.1. Síntomas ocasionados por PYVV	12
2.2.2. Epidemiología del virus PYVV	15
2.2.3. Transmisión del virus PYVV	17
2.2.4. Parámetros para la transmisión del virus PYVV	19
2.2.5. Detección del virus PYVV	22
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>25</b>
3.1. Ubicación del experimento	25
3.1.1. Lugar	25
3.1.2. Clima	25
3.2. Metodología	25
3.2.1. Crianza de la mosca blanca <i>T. vaporariorum</i>	26

3.2.2. Aislamiento de la colonia joven de <i>T. vaporariorum</i>	26
3.2.3. Instalación de plantas positivas como fuente del virus PYVV	28
3.2.4. Instalación de plantas libre de virus para inoculación del virus PYVV	29
3.2.5. Adquisición del virus por el vector <i>T. vaporariorum</i>	29
3.2.6. Inoculación del virus por el vector <i>T. vaporariorum</i>	30
3.2.7. Confirmación de éxito de transmisión	32
3.2.8. Transmisión seriada a temperatura fluctuante	34
3.2.9. Experimento adicional: Prueba de inoculación con 50 adultos de <i>T. vaporariorum</i>	36
3.2.10. Procedimiento para el modelamiento de los datos obtenidos	36
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>38</b>
4.1. Transmisión del virus PYVV usando un individuo como vector	38
4.2. Transmisión seriada del virus PYVV usando un individuo como vector a temperatura fluctuante	44
4.3. Prueba adicional: Transmisión del virus PYVV empleando un grupo de individuos virulíferos como vectores	47
4.4. Resultado aplicativo del Modelo	51
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>54</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>56</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>57</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>63</b>

## INDICE DE CUADROS

	<b>Pag.</b>
<b>Cuadro 1:</b> Características de la transmisión de algunos Crinivirus transmitidos por <i>T. vaporariorum</i> .	<b>21</b>
<b>Cuadro 2:</b> Porcentaje de transmisión del Virus del amarillamiento de las venas de la papa (PYVV) por <i>T. vaporariorum</i> a 5 temperaturas constantes.	<b>38</b>
<b>Cuadro 3:</b> Número de plantas infectadas con PYVV por medio de Transmisión seriada utilizando un adulto virulífero de <i>T. vaporariorum</i> en 3 épocas del año.	<b>44</b>
<b>Cuadro 4:</b> Eficiencia de transmisión del virus PYVV en la 3ra Temperatura fluctuante (Julio - Agosto) empleando el Modelo de transmisión del virus PYVV.	<b>46</b>
<b>Cuadro 5:</b> Porcentaje de transmisión a 5 temperaturas constantes utilizando 50 adultos virulíferos de <i>T. vaporariorum</i> (Westwood).	<b>47</b>
<b>Cuadro 6:</b> Número de plantas infectadas con PYVV en transmisión seriada utilizando 50 adultos virulíferos de <i>T. vaporariorum</i> con PAI de 24 horas durante 10 días continuos.	<b>50</b>

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1:</b> <i>T. vaporariorum</i> (Westwood), ninfa de cuarto estadio (“pupa”): a) vista ventral, b) orificio vasiforme.	<b>6</b>
<b>Figura 2:</b> a y b) Jaula de madera con dos mangas para crianza de insectos; c) Manutención de adultos de mosca con plantas de papa; d) Pupas colectadas; e) Planta de papa con adultos jóvenes o recién emergido; f) Adultos jóvenes emergidos.	<b>27</b>
<b>Figura 3:</b> a: siembra de plantas positivas en BIOTRON, b: plantas positivas a los 15 días de desarrollo, c: extracción de muestras para confirmación de virus, d: electroforesis de material obtenido después del RT-PCR y PCR.	<b>28</b>
<b>Figura 4:</b> Plantas libre de virus en invernadero a los 5 días después de siembra.	<b>29</b>
<b>Figura 5:</b> a: adultos de mosca blanca colectados en viales, b: sellado hermético, c: selección de hojas del tercio medio y superior; d y e: colección de un adulto de mosca blanca virulífera, f: infestación en planta sana libre de virus, g: Traslado de plantas infestadas a los BIOTRONES por un PAI de 72h.	<b>31</b>
<b>Figura 6:</b> a) reubicación de las plantas en el invernadero luego del PAI; b: plantas a los 30 del PAI; c: extracción de hojas en cada repetición; d, e y f: proceso de extracción y purificación de ácidos nucleicos.	<b>33</b>
<b>Figura 7:</b> a: plantas positivas después de 15 días de siembra; b: siembra de plantas sanas para las repeticiones de transmisión seriada; c: plantas libres de virus a los 7 días después de siembra; d) 1er PAI de la transmisión seriada; e) Repeticiones de transmisión seriada a los 30 días del PAI.	<b>35</b>
<b>Figura 8:</b> Sintomatología típica de PYVV observada en una de las repeticiones de la temperatura-tratamiento de 15 °C.	<b>39</b>

<b>Figura 9:</b>	Curva del Modelo de Transmisión del virus PYVV empleando un individuo de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood) en función a la temperatura.	<b>40</b>
<b>Figura 10:</b>	Interrelación entre los modelos de trasmisión del virus PYVV, supervivencia y oviposición total para <i>T. vaporariorum</i> en función a la temperatura.	<b>41</b>
<b>Figura 11:</b>	Detección del virus PYVV en adultos de <i>T. vaporariorum</i> recolectados luego del PAI en la temperatura-tratamiento de 18 °C.	<b>42</b>
<b>Figura 12:</b>	Eficiencia de transmisión del virus PYVV empleando 50 individuos de <i>T. vaporariorum</i> virulíferos a temperatura constante.	<b>48</b>
<b>Figura 13:</b>	Sintomatología típica de PYVV observada en una de las repeticiones de la temperatura-tratamiento de 12 °C infestado con 50 adultos virulíferos.	<b>48</b>
<b>Figura 14:</b>	Mapa de riesgo potencial de la presencia del virus PYVV para el año 2000 empleando el modelo de transmisión del virus obtenido con el software ILCYM.	<b>52</b>
<b>Figura 15:</b>	Mapa de riesgo potencial de la presencia del virus PYVV para el año 2050 empleando el modelo de transmisión del virus obtenido con el software ILCYM.	<b>53</b>



## INDICE DE ANEXOS

	<b>Pag.</b>
<b>Anexo 1:</b> Protocolo de extracción de ARN totales con Trizol.	<b>63</b>
<b>Anexo 2:</b> Determinación de la concentración de Ácidos nucleicos totales	<b>64</b>
<b>Anexo 3:</b> Detección de PYVV por RT-PCR.	<b>64</b>
<b>Anexo 4:</b> Electroforesis.	<b>66</b>
<b>Anexo 5:</b> Diagrama de flujo para el procedimiento de la transmisión del virus PYVV por su vector <i>Trialeurodes vaporariorum</i> .	<b>67</b>
<b>Anexo 6:</b> Confirmación por RT-PCR en cada temperatura-tratamiento empleando 1 individuo como vector.	<b>68</b>
<b>Anexo 7:</b> Detección de PYVV por RT-PCR en la temperatura-tratamiento a 12 °C.	<b>70</b>
<b>Anexo 8:</b> Confirmación por RT-PCR en cada tratamiento a temperatura constante empleando un grupo de 50 adultos virulíferos como vectores.	<b>72</b>
<b>Anexo 9:</b> Confirmación por RT-PCR de la transmisión seriada en la 3ra temperatura fluctuante empleando un adulto virulífero.	<b>72</b>
<b>Anexo 10:</b> Confirmación por RT-PCR de la transmisión seriada en temperatura fluctuante empleando un grupo de 50 adultos virulíferos.	<b>73</b>

## RESUMEN

La finalidad del presente estudio es poder predecir el efecto de la temperatura en el comportamiento del virus del amarillamiento de las venas de la papa o *Potato yellow vein virus* (PYVV), basado en la interacción con su vector *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) en función a la temperatura en la que el virus puede ser adquirido y transmitido eficientemente a través de un individuo adulto virulífero, generando una herramienta para poder predecir su potencial de diseminación en áreas en donde aún no está presente. Se determinó la eficiencia de la transmisión del virus PYVV a través de cinco experimentos controlados de laboratorio bajo diferentes temperaturas (12, 15, 18, 20 y 25 °C). Los adultos de mosca blanca fueron expuestos durante un periodo de 48 horas para el periodo de acceso a adquisición (PAA), luego los insectos virulíferos se transfirieron a plantas sanas (un insecto por planta) por un periodo de acceso a inoculación (PAI) de 72 horas. A los 30 días del PAI se confirmó la presencia del virus por medio de RT-PCR. Se obtuvo los más altos porcentajes de trasmisión del virus a 12 y 15 °C con 14 y 64 % respectivamente. Mientras que a 18, 20, 25 °C se obtuvo 4, 4 y 3 % de transmisión del virus respectivamente. Adicionalmente se realizó una transmisión seriada a temperatura fluctuante en 3 épocas del año (Verano – Otoño – Invierno) para corroborar el periodo de retención de la infectividad del insecto vector. Durante las 2 primeras épocas del año no se encontró éxito en la transmisión, mientras que en la época de invierno, se llegó a obtener una eficiencia de transmisión hasta el día 10 de inoculación y con un mínimo de 5 días para que PYVV pueda ser inoculado por su vector.

**Palabras clave:** *Potato yellow vein virus* (PYVV), transmisión, temperatura, vector.

## ABSTRACT

The purpose of this study is to predict the effect of temperature on the behavior of the *Potato yellow vein virus* (PYVV), based on the interaction with its vector *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) depending on the temperature at which the virus can be acquired and transmitted efficiently through a viruliferous adult, generating a tool to predict its potential transmission in areas where it is not present yet. The efficiency of PYVV transmission was determined through five controlled laboratory experiments at different temperatures (12, 15, 18, 20 y 25 °C). Whitefly adults were exposed for a period of 48 hours for the period of access to acquisition (PAA), then the viruliferous insects were transferred to free of virus plants (one insect per plant) for a period of access to inoculation (PAI) of 72 hours. At 30 days after the PAI, the presence of the virus was confirmed by RT-PCR. The highest transmission rates of the virus were obtained at 12 and 15°C with 14 and 64 % respectively. While at 18, 20, 25 °C, a percentage of 4, 4 and 3% of virus transmission were obtained respectively. Additionally, a serial transmission was made at natural fluctuating temperature during 3 seasons of the year (Summer – Autumn – Winter) to corroborate the period of infectivity retention by the vector. During the first 2 seasons of the year, no success was found in the transmission, while in winter time, transmission efficiency was reached until day 10 of inoculation and with a minimum of 5 days that PYVV can be inoculated by its vector.

**Key words:** *Potato yellow vein virus* (PYVV), transmission, temperature, vector.

## I. INTRODUCCION

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo de importancia económica en el mundo después del maíz, el trigo y el arroz (FAO, 2008); y es un cultivo que es afectado por numerosas plagas y enfermedades, siendo una de estas enfermedades de importancia el Virus del amarillamiento de las venas de la papa o *Potato yellow vein virus* (PYVV). El virus PYVV fue detectada por primera vez en 1937 en Inglaterra, en plantas de papa procedentes de Sudamérica. Es originaria de Ecuador y de allí fue introducida a Colombia al departamento de Antioquia a través de semilla de papa infectada con el virus (Zapata *et al.*, 2004). Este virus es transmitido de forma semipersistente por su vector natural *Trialeurodes vaporariorum* o también conocido como la mosca blanca de los invernaderos (Zapata *et al.*, 2004; Cardona, 2005; Morales, 2006); así mismo la enfermedad puede ser diseminado por medio de tubérculos usados como semillas botánicas a diferentes zonas, ya que esta enfermedad puede estar presente en el campo sin presentar síntomas (Salazar, 1995; Zapata *et al.*, 2004). Cuando las plantas manifiestan los síntomas, estos se caracterizan por presentar un amarillamiento de las venas, el cual empieza en las venas terciarias, diseminándose a las venas secundarias y primarias y finalmente puede generar un amarillamiento general de la lámina foliar (Salazar *et al.*, 2000). PYVV es un virus reemergente que afecta muchas zonas de cultivo de papa de países andinos, pudiendo generar una reducción del rendimiento de hasta un 50 % (Salazar *et al.*, 2000).

*T. vaporariorum* es un vector endémico que puede adaptarse a diferentes climas y pisos altitudinales, además de tener un amplio rango de cultivos susceptibles en los cuales algunos pueden ser hospederos asintomáticos del virus PYVV, como es el caso de algunas malezas (Arciniega, 2003; Zapata *et al.*, 2004; Cardona, 2005; Morales, 2006). Numerosos estudios han confirmado a *T. vaporariorum* como vector del virus PYVV, pero aún no se han realizado estudios para determinar la influencia que puede tener la temperatura en la eficiencia de transmisión del virus.

Actualmente, debido al cambio climático y el calentamiento global es probable que *T. vaporariorum* pueda migrar a nuevas zonas de valles interandinos, para ello se desarrolló un modelo fenológico basado en la temperatura para *T. vaporariorum* utilizando el software ILCYM (Insect Life Cycle Modeling software) donde se pudo predecir los cambios de la tasas de multiplicación, supervivencia y actividad del vector, vinculando luego este modelo a un Sistema de información Geográfica (GIS), generando mapas de riesgo donde se proyecta la distribución actual y las futuras áreas en riesgo de expansión de la plaga (Gamarra, 2016), Sin embargo, el modelo no tiene en cuenta el efecto de la temperatura sobre la eficiencia de transmisión del virus.

Por ello, el presente estudio tiene como objetivo principal determinar el modelo de transmisión del virus PYVV en *Solanum tuberosum* en función de la temperatura mediante el empleo de un adulto virulífero de *T. vaporariorum*. Asimismo, poder observar el periodo de retención de la infectividad del insecto vector (transmisión seriada).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. La mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum*

#### 2.1.1. Clasificación

La especie *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856), pertenece a la Subfamilia Aleyrodinae, Familia Aleyrodidae y Orden Hemiptera (Martin, 2007).

#### 2.1.2. Biología de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*

Es un insecto hemimetábolo (metamorfosis incompleta), que presenta los siguientes estados de desarrollo: huevo, ninfa (cuatro estadios) y adulto, desarrollándose generalmente en el envés de las hojas de los cultivos (Gerling, 1992; Salazar et al., 2000; Zapata et al., 2004; Cardona, 2005; Morales, 2006; Smith, 2009; Carapia, 2013).

La duración del ciclo total de huevo a emergencia de adultos varía de acuerdo a factores como la temperatura, la humedad, la edad de la planta, y del hospedante en el que se están alimentando, siendo la temperatura el factor principal que influye en el desarrollo del ciclo de vida del insecto (Zapata et al., 2004; Granadillo, 2011). Para *T. vaporariorum* el rango de temperatura óptima para el desarrollo es de 20 – 25 °C (Smith, 2009); y según Granadillo (2011), pueden desarrollarse óptimamente entre 20 – 30 °C; con una humedad óptima de 75 – 80 %, siendo las condiciones de invernadero ideales para el desarrollo rápido de la mosca blanca (Zapata et al., 2004; Smith, 2009).

#### **Descripción de los estados de desarrollo de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum***

##### **- Huevo:**

El huevo de mosca blanca es liso, alargado, la parte superior termina en punta y la parte inferior es redondeada, se fija al envés de la hoja por medio de un pedicelo. En promedio un

huevo mide 0.23 mm de longitud y 0.1 mm de anchura (Morales, 2006; Carapia, 2013). Los huevos son inicialmente blancos, luego toman un color amarillo y finalmente se tornan café oscuro cuando están próximos a eclosión (Cardona, 2005; Morales, 2006; Smith, 2009; Carapia, 2013). La hembra de mosca blanca pone los huevos en forma individual o en grupos (Cardona, 2005), o en círculos o semicírculos en la hoja (Carapia, 2013); y pueden producir hasta 300 huevos en su vida (Smith, 2009). Los huevos eclosionan de 3 a 6 días (Morales, 2006; Arciniegas, 2003), pero también pueden llegar hasta los 8 días para su eclosión (Smith, 2009) dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad.

- **Estado ninfal:**

La mosca blanca pasa por 3 estadios ninfales y un cuarto estadio conocido como “pupa”.

**Primer estadio o “Crawler”**

Una vez eclosionado el huevo emerge una pequeña ninfa llamada migrante o “crawler”. Es plana, oval, casi transparente y mide 0.27 mm de longitud y 0.15 mm de anchura (Morales, 2006; Carapia, 2013); con patas pequeñas que permiten moverse a través de la superficie foliar. Después de la eclosión se desplaza sobre la superficie de la hoja hasta que encuentra con éxito un lugar apropiado para alimentarse, introduciendo su estilete en la hoja para obtener la savia, donde se fija para alimentarse (Smith, 2009). De allí en adelante la ninfa es sésil y permanece en este lugar hasta que se convierta en un adulto (Cardona, 2005). Antes de la muda en la siguiente etapa ninfal, el cuerpo se dilata para hacerse más redondeado (Smith, 2009). Este estadio puede tener una duración en promedio de tres días (Cardona, 2005), según Morales (2006) puede llegar a los 4 días; y según Smith (2009) puede llegar a los 6 días, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad.

**Segundo estadio**

La ninfa de segundo estadio es translúcida, de forma oval con bordes ondulados, midiendo 0.38 mm de longitud y 0.23 mm de anchura (Morales, 2006) y según Carapia (2013) puede medir 0.42 mm de largo y 0.33 de ancho. Con una duración promedio de 2 - 3 días (Cardona, 2005; Smith, 2009), pudiendo prolongarse hasta los 4 a 5 días (Arciniegas, 2003, Morales, 2006) dependiendo de las condiciones de humedad y temperatura.

### **Tercer estadio**

La ninfa de tercer estadio es oval, aplanada y translúcida, semejante a la de segundo estadio. El tamaño aumenta al doble del primer estadio (0.54 mm de longitud y 0.33 mm de anchura) (Morales, 2006), y según Carapia (2013), puede llegar a medir entre 0.56 – 0.6 mm de largo y 0.4 mm de ancho. Se observa con facilidad sobre el envés de la hoja sin necesidad de lupa (Cardona, 2005). Presenta una duración promedio de tres días (Cardona, 2005; Morales, 2006; Smith, 2009), y según Arciniegas (2003) este estadio puede durar entre 4 a 5 días.

### **Cuarto estadio (“pupa”)**

Cardona (2005) y Morales (2006), mencionan que la ninfa recién formada de cuarto estadio es oval, plana y casi transparente y a medida que avanza su desarrollo se torna opaca y en ese momento se le da el nombre de “pupa”. Presenta hilos de cera largos y erectos que le son característicos. De perfil luce elevada con respecto a la superficie de la hoja y pudiendo observarse los ojos con facilidad cuando están próximas a la emergencia (Morales, 2006). La pupa mide 0.73 mm de longitud y 0.45 mm de anchura y con una duración promedio del cuarto estadio de ocho días (Morales, 2006). Según Carapia (2013) las dimensiones llegan a 0.78 – 0.8 mm de largo y 0.51 mm de ancho.

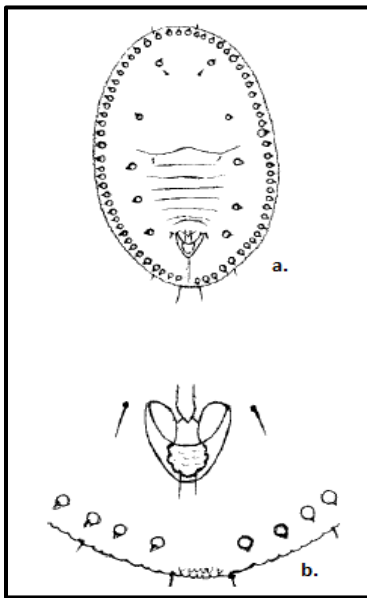
Smith (2009), reporta que el estadio de “pupa” comienza en la cuarta etapa de ninfa siendo planas y ovaladas. Al final de esta etapa deja de alimentarse, se hincha, se vuelve más denso y forma una cubierta cerosa. En apariencia es de color blanco cremoso y de 0,7 mm de largo. A veces la pupa se pone de color negro, indicando que ha sido atacado por la avispa parásita *Encarsia formosa*. También puede resultar gris, marrón o amarilla debido a los ataques de otras avispas parásitas. Poco antes de que emerja el adulto, se pueden apreciar sus ojos a través de la piel de la pupa. Este estadio dura entre 8 a 9 días dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad.

*T. vaporariorum* es difícil identificar mediante características morfológicas de los adultos, ya que tiene similitudes morfológicas con algunas especies de mosca blanca como *B. afer* (Gamarra *et al.*, 2010), por lo tanto, este estadio es importante para realizar la identificación



de la especie, basándose en el estudio morfológico del cuarto estadio ninfal o "pupa" (Zapata *et al.*, 2004; Morales, 2006; Smith, 2009; Carapia, 2013).

Las pupas vivas de *T. vaporariorum* tienen la superficie dorsal elevada por la palizada de la superficie ventral, la cual está sobre la superficie de la hoja; la superficie dorsal con cubierta y varillas de cera blanquecina, área submarginal con filamentos cortos de cera; superficie ventral y lateral con cubierta de cera. Los especímenes son de forma elíptica, redondeados posteriormente; papilas dorsales y submarginales presentes; margen uniformemente granulado; el área porosa traqueal torácica y caudal se diferencian distintivamente en el margen; antenas situadas lateralmente de las patas protorácicas; sedas marginal anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal presentes; pliegue torácico traqueal no indicado ventralmente; orificio vasiforme semicordiforme; língula tri lobulada (Figura 1) (Carapia, 2013).



**Figura 1:** *T. vaporariorum* (Westwood), ninfa de cuarto estadio (“pupa”): a) vista ventral, b) orificio vasiforme.

## Adulto

El cuerpo del adulto de la mosca blanca es de color amarillo limón; las alas son translúcidas angostas en la parte anterior, ensanchándose hacia atrás y cubiertas por un polvillo blanco. Los ojos son de color rojo oscuro. Las hembras son de mayor tamaño que los machos, llegando a vivir entre 5 a 28 días (Morales, 2006).

Según Morales (2006), el adulto recién emergido mide aproximadamente 1.3 mm de longitud, pudiendo también variar entre 0.75 a 1.1 mm de longitud (Carapia, 2013); los cuales copulan apenas emergen, pero puede haber un período de pre-oviposición de un día. Tienen el hábito de alimentarse y oviponer en el envés de las hojas jóvenes, las cuáles seleccionan por atracción de color. Una hembra puede llegar a poner entre 80 y 300 huevos (Morales, 2006).

Smith (2009), reporta que cuando el adulto emerge sus alas son claras al principio, pero con el tiempo se convierten con una cubierta de cera blanca, teniendo una forma triangular vista desde arriba. Un adulto puede volar dentro de unas horas y comienza a alimentarse succionando la savia de la planta. Los machos tienen una dimensión aproximada de unos 0,9 mm y las hembras son aproximadamente 1,1 mm de largo, y con un tiempo de vida que puede fluctuar entre 10 a 40 días; y dependiendo de la temperatura la hembra puede comenzar a oviponer entre 1 a 3 días de edad adulta.

De acuerdo a Manzano (2009), se determinaron los valores estadísticos del ciclo de vida de la mosca blanca *T. vaporariorum*, en cámara ambiental en dos cultivares (cv.) de fríjol obteniéndose que la longevidad media de *T. vaporariorum* en el cv. Chocho fue mayor a 19 °C (22.6 días), intermedia a 22 °C (17.5 días) y menor a 26 °C (5.9 días); mientras que en el cv. ICA-Pijao la longevidad media fue de 35.5 días a 19 °C. La fecundidad media total en el cv. Chocho fue 8.6, 32.6 y 33.3 huevos por hembra a 19, 22 y 26 °C respectivamente, mientras que la fecundidad en el cv ICA-Pijao fue mucho más alta, 127. 2 huevos por hembra a 19 °C.

No existe un estadio resistente al invierno o que tenga una fase de reposo, pero los adultos de mosca blanca de invernadero pueden pasar el invierno en las malas hierbas o plantas de los invernaderos u otros sitios protegidos, mientras que las ninfas y pupas sobreviven cortos períodos fríos en microclimas favorables tales como áreas junto a invernaderos o donde los inviernos son suaves (Smith, 2009).

### **2.1.3. Comportamiento poblacional de *Trialeurodes vaporariorum***

#### **Adaptación**

Cardona (2005) y Morales (2006), mencionan que *T. vaporariorum* se adapta muy bien a regiones con altitudes entre 950 y 3000 msnm (valles interandinos y zonas de ladera), con temperaturas promedio de 18 a 22 °C y humedades relativas superiores al 60 %. Las lluvias fuertes son un factor importante en la dinámica de población de moscas blancas, porque disminuyen el número de adultos en campo y pueden desprender gran cantidad de ninfas, lo cual ocasiona disminución de los niveles de infestación.

#### **Dispersión**

Según Cardona (2005) y Morales (2006), la mayoría de los adultos emergen en el día y se mueven poco en la noche aumentando su actividad en las primeras horas de la mañana y se mantiene durante el resto del día. Inicialmente con vuelos cortos; a partir de los nueve días de vida su desplazamiento es mayor (hasta dos metros por día). Aunque este insecto es mal volador, las corrientes de aire lo dispersan fácilmente de un cultivo a otro. Otro factor que facilita la dispersión de la mosca blanca entre cultivos y regiones, es el transporte de plantas infestadas de un sitio a otro.

Según lo mencionado por Smith (2009), la mosca blanca del invernadero tiende a permanecer en grupos hasta que la población se vuelva densa. Esto significa que las infestaciones tienden a permanecer concentradas en algunos lugares, especialmente durante las primeras etapas del cultivo. Posteriormente por el aumento de las temperaturas, se vuelven más activos y se extienden ampliamente sobre toda la cosecha. El adulto es la etapa más importante de la dispersión de la plaga.

## **Distribución**

Smith (2009), menciona que sólo el primer estadio ninfal (crawler) de la mosca blanca del invernadero es capaz de tener movimiento, y éste se limita a distancias cortas, generalmente en la misma hoja que eclosionó. Los adultos de mosca blanca, por lo general, ponen huevos en las hojas jóvenes en la parte superior de la planta, así como la planta crece, las ninfas jóvenes se encuentran en la parte superior de la planta y los estadios más avanzados se encuentran en la parte inferior.

## **Crecimiento Poblacional**

Según Smith (2009), el crecimiento de la población está influenciado por el tipo de planta hospedante y la temperatura. Por lo que si alguna colonia se origina en tomates entonces se desarrollará mejor en otro cultivo de tomate que en un tipo diferente de cultivo como el pepino. El manejo agronómico deficiente a menudo fomenta la acumulación y la propagación de la mosca blanca, como por ejemplo plantas estresadas por bajo riego, temperaturas extremas, pobre fertilidad, pH bajo, luz, incorrecto medio de cultivo, etc. Los niveles de nitrógeno alto también se han relacionado con picos de crecimiento de la población de mosca blanca.

### **2.1.4. Daños ocasionados por *Trialeurodes vaporariorum***

#### **Daño directo:**

El daño directo es producido tanto por las ninfas como los adultos al succionar la savia de las hojas tiernas, lo que provoca un estrés en la planta que puede ser importante si la densidad de la población del insecto es alta, también puede provocar clorosis y a veces marchitez en las hojas (Zapata *et al.*, 2004; Cardona, 2005; Morales, 2006).

#### **Daño indirecto:**

Los adultos y ninfas al momento de alimentarse secretan sustancias azucaradas que favorecen ataques secundarios de fumagina (*Capnodium* sp), disminuyendo el área fotosintética e interfiriendo con la transpiración de la planta (Zapata *et al.*, 2004; Cardona, 2005; Morales, 2006; Granadillo, 2011).

Otro efecto indirecto, y el más importante, es la transmisión de virus; muchos de los cuales son de importancia económica (Jones, 2003; Zapata *et al.*, 2004; Cardona, 2005; Morales, 2006). Y esto adquiere mayor importancia, ya que las poblaciones de mosca blanca se han incrementado dramáticamente, especialmente en las áreas tropicales y subtropicales, aumentando también la importancia de los virus transmitidos por ellas (Arciniegas, 2003).

Se calculan alrededor de 1300 especies de mosca blanca dentro de 120 géneros, pero relativamente pocos transmiten virus de plantas. Sólo moscas blancas en los géneros *Bemisia* y *Trialeurodes* son vectores de virus (Jones, 2003; Cardona, 2005; Morales, 2006). Tanto ninfas como adultos se alimentan insertando su pieza bucal o probóscis en la hoja, penetrando en el floema y succionando la savia, durante este proceso de alimentación adquieren el virus y también se inocula el virus a una nueva planta; sin embargo es el adulto quien disemina y se dispersa transmitiendo el virus a nuevas plantas mientras se alimenta (Jones, 2003). *T. vaporariorum* puede ser vector de diferentes virus como *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Cucurbit chlorotic spot virus* (CCSV), *Beet pseudo yellow virus* (BPYV); *Strawberry pallidosis-associated virus* (SPAV) y *Potato yellow vein virus* o Virus del amarillamiento de las venas de la papa (PYVV) (Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012).

Los síntomas de TICV en tomate son similares a los producidos por BPYV en cucurbitáceas, aparecen primeros como manchas cloróticas angulares en hojas inferiores. Eventualmente las áreas entre las nervaduras de las hojas se vuelven totalmente cloróticas con excepción de las venas, que permanecen verdes. Mientras que progresa la infección, las plantas se convierten más amarillas, aunque las hojas jóvenes parecen normales. Los síntomas de TICV y ToCV son muy similares en tomate, típico de otros miembros de este género, incluyendo amarillamiento intervenal, moteado necrótico, laminación de hojas inferiores y engrosadas, hojas crujientes inferiores, mientras que el follaje superior parece normal (Wisler, 1998).

Los síntomas más comunes causados por enfermedades virales son diversos desde mosaicos, moteados, clorosis de las hojas, arrugamientos, enanismo hasta necrosis. La sintomatología puede variar mucho, dependiendo de las condiciones ambientales y las variedades cultivadas. Por lo tanto, en determinadas circunstancias y variedades, algunos virus pueden ser letales o totalmente asintomáticos (Pumisacho, 2002) como se da en el caso de PYVV.

## 2.2. Virus del amarillamiento de las venas de la papa o “*Potato yellow vein virus*” (PYVV)

La enfermedad conocida como Virus del amarillamiento de las venas de la papa es causada por *Potato yellow vein virus* (PYVV) (Salazar *et al.*, 2000), fue detectada por primera vez en 1937 en Inglaterra, en plantas de papa procedentes de Sudamérica. Es originaria de Ecuador y de allí fue introducida a Colombia al departamento de Antioquia a través de semilla de papa infectada con el virus (Zapata *et al.*, 2004).

El virus del amarillamiento de las venas de la papa pertenece al género Crinivirus de la familia Closteroviridae, los virus de esta familia son limitados al floema y son considerados los más largos y complejos dentro de los fitovirus (German-Retana *et al.*, 1999). Poseen una forma filamentosa flexuosa altamente inestable con partículas que miden desde 650 a 900 nm de longitud, con un diámetro de 12 nm y un genoma segmentado en dos ARN generalmente (caso especial PYVV con 3 ARN) (German-Retana, 1999; Livieratos *et al.*, 2004; Gil, 2010).

PYVV es un virus de ARN de cadena sencilla y sentido positivo, que actúa como ARN mensajero en la célula infectada, estos virus se encuentran en las células del floema y su transmisión ocurre por insectos de la familia Aleyrodidae de forma semipersistente; no pudiendo ser transmitidos de manera mecánica (Jones, 2003; Wintermantel, 2004; Gil, 2010).

El virus presenta una baja variación genética entre los aislamientos de Perú y Colombia, siendo éstas las regiones de referencia debido a que sus cultivos son los más afectadas por la enfermedad. Cubillos (2011), llevó a cabo un estudio sobre la variabilidad viral de *Potato yellow vein virus* (PYVV) con respecto a 3 genes: el gen de la proteína mayor de la cápside mayor (CP), de la proteína menor de la capsida (CPm) y de la proteína de choque térmico (Hsp70) mediante la técnica de SSCP (Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla), y obteniendo como resultado 8 perfiles para el gen Hsp70, 2 perfiles para la CP y 6 perfiles para el gen CPm dentro de un grupo de 501 muestras. Por otro lado Cubillos (2011), reporta que existe una posible explicación de esta baja variabilidad genética en PYVV, la cual podría ser que este virus es un virus reemergente y de poco peso evolutivo en la fijación de variantes. Sin embargo, faltaría realizar análisis sobre clones y secuencias de otros genes para

confirmar el número de variantes. Según lo reportado por Gil (2010), mediante análisis moleculares se encontró bajos niveles de variación y diferenciación con respecto a cepas de referencia de otros lugares del mundo en el virus PYVV.

### **2.2.1. Síntomas ocasionados por PYVV**

PYVV se localiza en el floema de la planta y cuando causa síntomas de amarillamiento de las nervaduras, produce diferentes grados de clorosis asociados con la reducción de la capacidad fotosintética, dificultad para la translocación de nutrientes y pérdida del vigor general de la planta (Salazar *et al.*, 2000). El primer síntoma que aparece en la planta es el amarillamiento en la porción apical de las nervaduras de las hojas, posteriormente las nervaduras secundarias también son afectadas, tornándose completamente amarillas y las nervaduras pueden recuperar su color verde (Salazar *et al.*, 2000; Gil, 2010).

Los síntomas de la enfermedad se observan en el follaje; y estudios relacionados con su expresión mostraron que de una planta madre infectada se puede obtener plantas hijas con o sin síntomas (Salazar *et al.*, 2000; Zapata *et al.*, 2004). De igual forma, al sembrar semilla proveniente de las anteriores plantas, se puede obtener el mismo resultado por varias generaciones (Zapata *et al.*, 2004).

Estudios previos han mostrado que la infección por miembros de la familia Closteroviridae induce a la formación de cuerpos citoplasmáticos de inclusión característicos de las células asociadas a los plasmodesmos, incluyendo el parénquima del floema y células acompañantes (German-Retana, 1999), degenerando cloroplastos y mitocondrias y obstaculizando los haces vasculares, alterando la fotosíntesis y el metabolismo de la planta, lo cual se evidencia por la clorosis de las hojas, reducción del vigor y enanismo de la planta (Salazar *et al.*, 2000; Arciniegas, 2003; Zapata *et al.*, 2004; Wintermantel, 2008); y en el caso del PYVV ocasionando disminución en la producción de tubérculos entre un 25 % a un 50 % en países andinos (Salazar *et al.*, 2000).

Arciniegas (2003), observó en el Clon 1 de *S. phureja* la aparición de síntomas entre los 28 a 32 días después de haber sido inoculadas con 100 adultos de *T. vaporariorum* (4 días de exposición a los adultos virulíferos), con un previo periodo de exposición de 24 horas en una planta fuente del virus PYVV de la misma variedad. Los síntomas fueron más evidentes en el tercio inferior y medio de las plantas, mientras que las nuevas hojas siguieron un crecimiento aparentemente normal.

Según Zapata *et al.* (2004), en papa, se pueden presentar dos tipos de síntomas:

- Los síntomas primarios, se pueden observar cuando una planta de papa sana creciendo en condiciones de campo o invernadero es afectada por primera vez por el virus, en el caso del virus PYVV los síntomas comienzan con aclareo y posterior amarillamiento de nervaduras terciarias, los espacios intervenales permanecen verdes por un tiempo, luego se amarillean las nervaduras secundarias y toda la hoja puede adquirir el color amarillo; la velocidad del amarillamiento, depende de la cantidad de luz recibida, mientras más horas de sol, más rápido se desarrollan los síntomas.
- Los síntomas secundarios, se pueden expresar o no. Estos se presentan cuando se siembra semilla vegetativa (tubérculos, brotes, esquejes, entre otros) procedente de una planta con síntomas primarios, en el caso de PYVV se inicia con manchas cloróticas menores de un milímetro en cualquier parte de la lámina foliar que van aumentando de tamaño hasta formar grandes manchas de forma irregular que cubren los bordes del foliolo, también se puede presentar amarillamiento de las nervaduras. Cuando se siembra semilla proveniente de una planta afectada por el virus y los síntomas se expresan muy temprano, la planta puede mostrar un amarillo intenso al principio, el cual se torna pálido a medida que la planta comienza la maduración; este fenómeno se debe posiblemente a cambios fisiológicos de la planta, a variantes o razas de virus, sin embargo, la variabilidad de este último parece ser muy poca.

Según Ortega (2005), La enfermedad se manifiesta, tanto en la parte aérea como en la parte subterránea de la planta:



- En la parte aérea, inicialmente el follaje muestra un amarilleo brillante en las venas terciarias de las hojas, en una parte o en toda la planta. Cuando la intensidad de los síntomas se incrementa, el amarillamiento se disemina a las venas secundarias y entre las venas primarias de los folíolos apicales, laterales, secundarios e intersticiales de la lámina de la hoja (Díaz 1966; Vega 1970; citados por Ortega, 2005). El color es más notable en las hojas que se han expandido antes de que la enfermedad se establezca completamente y permanece durante el periodo de vida de las hojas enfermas. En ocasiones, las hojas que se presentan los síntomas son más ásperas que las hojas aparentemente sanas. Otros síntomas presentes son: algo de rugosidad, presencia de manchas necróticas pequeñas (Hooker 1981; citado por Ortega, 2005) y un desarrollo menor al de las plantas sanas (Díaz 1966; citado por Ortega, 2005). Los mayores niveles de incidencia reportados para esta enfermedad en campos comerciales de papa, varían desde 56 % en Ecuador hasta 100 % en Colombia (Ortega, 2005).
- En la parte subterránea, los tubérculos provenientes de plantas infectadas presentan yemas prominentes y anormales, las cuales se proyectan hacia afuera en forma de nudosidades que sugieren el síntoma de crecimiento secundario y, algunas veces, en forma ahusada (Vega 1970, citado por Salazar 1996). Por otra parte, el número y tamaño de los tubérculos es menor a los que provienen de las plantas normales (Vega, 1975; citado por Ortega, 2005) y el número de ojos en los tubérculos provenientes de plantas enfermas es menor al existente en las plantas sanas (Saldarriaga *et al.*, 1988; citado por Ortega, 2005).

### **2.2.2. Epidemiología del virus PYVV**

La capacidad de invasión del virus PYVV en la planta es lenta e irregular, lo que origina que una proporción comprendida entre 50 y 75 % de los tubérculos resulten infectados y que una de las partes de las plantas puede mostrar síntomas, mientras que otras no; la aparición de los síntomas y el efecto de la enfermedad en los rendimientos son variables dependiendo de la variedad, el origen de la semilla y de las condiciones ambientales (Salazar, 1996).

En condiciones de campo el virus puede permanecer en forma natural en algunas malezas que no muestran síntomas, tales como el corazón herido (*Polygonum nepalense* Meisn.), barbasco (*P. segetum* H.B.K.), lengua de vaca o remasa (*Rumex obtusifolium* L.), ruda amarilla (*Tajetes* sp) y cortejo o vinca (*Vinca rosea*) (Arciniega, 2003; Zapata *et al.*, 2004; Cardona, 2005; Morales, 2006).

### **Efecto de la temperatura**

Según Salazar (1995) y Zapata *et al.* (2004), la temperatura juega un papel importante en la expresión de síntomas ocasionados por virus. La mayoría de los virus tiene requerimientos estrictos de temperatura para la infección, la acumulación en el tejido de la planta y expresión de síntomas. El efecto de la temperatura es tan marcado en algunos virus que puede conducir a la erradicación completa de ellos. El efecto de la alta o baja temperatura sobre la multiplicación y acumulación de virus y viroide es usado como un método para liberar plantas de estos agentes (Salazar *et al.*, 1985). Aun no hay estudios de la temperatura máxima en la que el virus de PYVV es transmitido por *T. vaporariorum* o de la temperatura máxima en la cual prospera PYVV en la planta de papa.

### **Efecto de la luz**

Las plantas que crecen en condiciones de alta iluminación en el invernadero, usualmente son menos susceptibles que aquellos que crecen en el campo durante días nublados, sin embargo, para el caso de PYVV parece ser que la enfermedad es favorecida por las épocas de días largos y soleados (Zapata *et al.*, 2004).

Sin duda, la luz afecta la infección y la producción de síntomas por un virus, pero una vez que la planta es infectada, no es probable que se presente una variación de síntomas dentro de periodos cortos (Salazar, 1995).

## **Condición nutricional de las plantas**

Cuando las plantas se someten o un crecimiento con escaso nivel de nutrientes, expresan síntomas muy similares o los ocasionados por virus y pueden ser confundidos con estas. Por ejemplo, la deficiencia de elementos menores puede causar síntomas muy similares a los de virus, es así como el amarillamiento intervenal (síntoma característico de PYVV) está asociado con deficiencia de magnesio. Por otro lado, el exceso de nutrientes casi siempre tiende a enmascarar los síntomas virales por periodos cortos de tiempo (Zapata *et al.*, 2004).

## **Edad de las plantas**

Según Salazar (1995) y Zapata *et al.*, (2004), una planta durante las diferentes etapas fenológicas de su periodo vegetativo, es susceptible a un virus determinado en diferentes grados. Cuando las plantas se tornan más viejas, los virus se diseminan más lentamente de las hojas inoculadas a las otras hojas u otras partes de la planta; este fenómeno se llama “resistencia de planta adulta”.

## **Enmascaramiento de síntomas o latencia**

El desarrollo de síntomas depende del hospedante, del patógeno y de las condiciones ambientales. Por esto, se encuentran plantas susceptibles que no presentan síntomas (Pumisacho, 2002). Si esta ausencia es permanente se conoce como latencia o inapariencia permanente. Esto, en ocasiones puede ser contraproducente para programas de mejoramiento, ya que cuando no se hace selección en el lugar adecuado, se pueden seleccionar materiales equivocados (Salazar, 1995; Zapata *et al.*, 2004).

La concentración viral se puede manifestar o incrementar de una generación a la siguiente y aunque no siempre la presencia del virus produce síntomas, la producción si puede ser afectada. Además, plantas asintomáticas con baja concentración del virus pueden ser focos de dispersión de la enfermedad (Arciniegas, 2003).

### **2.2.3. Transmisión del virus PYVV**

Los Crinivirus se transmiten de modo semipersistente y no circulativa en sus vectores, siendo adquiridos por el vector de la mosca blanca después de la alimentación en períodos tan cortos como de una hora; sin embargo, la eficiencia de la transmisión aumenta con períodos de alimentación más largos de hasta 48 horas. A diferencia de los Begomovirus, los Crinivirus sólo pueden ser transmitidas por un tiempo limitado que oscila de 1 a 9 días dependiendo del virus (Arciniega, 2003).

#### **Formas de transmisión de PYVV**

El virus PYVV puede ser transmitido de las siguientes formas:

##### **- Por tubérculos semillas**

En las progenies subsiguientes a la primera inoculación se producen tubérculos semilla infectados, aunque en algunos casos pueden producir plantas asintomáticas. Según Salazar *et al.* (2000), las plantas asintomáticas pueden resultar positivas al utilizar técnicas de diagnóstico molecular como el NASH (Nucleic Acid Spot Hybridization / Hibridación de los Ácidos Nucleicos), indicando que los síntomas por si solos no pueden utilizarse como diagnóstico. Esta segregación de plantas con síntomas y asintomáticas está relacionado con el estado de infección viral, es decir la cantidad de inóculo en los tubérculos semilla y en la planta inoculada. Al momento, no se ha podido demostrar transmisión por semilla sexual de papa, ni por inoculación de savia (Salazar *et al.*, 2000).

Según Salazar (1995) y Zapata *et al.* (2004), PYVV puede transmitirse por partes de la planta usadas para la propagación (tubérculos, esquejes, brotes, entre otros).

##### **- Transmisión por injerto**

Según Salazar *et al.*, (2000), PYVV es fácilmente transmitido por injerto de tallo aéreo y subterráneo. En el CIP el mantenimiento del PYVV lo realizan en invernaderos a prueba de insectos, donde las transmisiones se efectúan injertando de lado plantas de papa donadoras

en plantas de papa receptoras sanas de la misma variedad que adquirieron el síntoma, y almacenando los tubérculos de las plantas infectadas.

#### - **Transmisión por vector natural con moscas blancas**

Las moscas blancas transmiten los Crinivirus de manera semipersistente (Salazar, 1995, Zapata *et al.*, 2004, Gamarra, 2002), y se ha probado que un periodo de ayuno de 1 a 3 horas favorece su transmisión (German-Retana, *et al.* 1999). No existen evidencias de multiplicación del virus en moscas blancas, ni tampoco de una transmisión transovárica.

Podría ser que la CPd de los Crinivirus facilite la interacción entre los viriones y el intestino del insecto vector (German-Retana *et al.*, 1999), por lo que la eficiencia de transmisión utilizando estas moscas blancas es de 90 a 100 %, teniendo en cuenta que los síntomas varían en el tiempo, de la susceptibilidad de las plantas al virus y de las condiciones ambientales en que se trabaje (Salazar, 1995; Cubillos, 2011); dándole además importancia a este insecto por su amplia distribución geográfica en el trópico, subtropical y zonas templadas del mundo, al gran número de especies vegetales cultivadas que afecta y por su amplio rango de hospederos cultivados y silvestres (Zapata *et al.*, 2004).

#### **2.2.4. Parámetros para la transmisión del virus PYVV**

Gamarra (2002, 2010) comprobó en sus estudios periodos que determinan el éxito de la transmisión del virus SPCSV con un insecto adulto de la mosca blanca a dos condiciones de temperatura constante, siendo estas las siguientes:

##### **Periodo de Acceso a Adquisición (PAA)**

Conocido como el período permitido para que el vector adquiriera al virus, para luego poder transmitirlo a una planta sana. Esto sucede cuando el vector introduce su estilete al tejido del parénquima para alimentarse del floema de la planta infectada con PYVV.

El PAA mínimo necesario para moscas blancas avirulíferas puede ser desde 1 hasta 48 horas. En general, la eficiencia de transmisión de las moscas blancas aumenta hasta un punto de saturación, con los correspondientes incrementos en el PAA (Duffus, 2001).

Saldarriaga (1988, citado por Gamarra *et al.*, 2010), realizó estudios de transmisión del virus PYVV con *T. vaporariorum* utilizando períodos de adquisición de 72 horas a 5 días obteniendo la transmisión de la enfermedad mediante el empleo de 1 adulto de mosca blanca hasta grupos de adultos virulíferos.

Navarro (1988) (citado por Gamarra 2002, 2010), obtuvo un 50 % de transmisión utilizando 20 moscas blancas por planta. Mientras que, Días y Pulgarín (1989) (Citado por Gamarra, 2002, 2010), empleando la misma cantidad de adultos, obtuvo un 64 % de transmisión.

Rubinstein (1997), realizó algunas pruebas de transmisión del virus TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) con su vector *B. tabaci*; obteniendo una transmisión del 100 % con 48 horas de periodo de adquisición (3 adultos virulíferos por planta no virulífera), y observando además que el vector retuvo el virus hasta los 12 días después de su adquisición. Adicionalmente observó, que mientras más edad tenía un adulto no virulífero en adquirir el virus, menor era la capacidad de adquisición del virus y por consiguiente menor era la eficiencia de transmisión.

### **Periodo de Acceso a Inoculación (PAI)**

Conocido como el período permitido para que el vector logre transmitir al virus a la planta. Para ello se han realizado diversos trabajos donde los tiempos de exposición son diversos. El PAI que necesitan las moscas blancas virulíferas para inocular a las plántulas sanas con el virus es determinada por un PAA apropiado (generalmente de 24 a 48 horas), y transfiriendo a la plántula sana un grupo de insectos suficientemente grande, generalmente de 20 a 40 insectos, siendo el PAI desde 1 a 48 horas (Duffus, 2001).

Saldarriaga *et al.*, (1988; citado por Gamarra, 2002, 2010), reportó que para transmitir el virus PYVV con *T. vaporariorum*, empleó períodos de inoculación desde 5 minutos hasta 5 días, y encontró que el período mínimo para la transmisión del virus era 30 min.

Estudios realizados en condiciones de invernadero han demostrado que la enfermedad se logra transmitir con una mosca blanca portadora del virus; sin embargo, la eficiencia de transmisión se incrementa a medida que se aumenta la población del vector; 20 moscas por planta son más que suficientes para transmitir eficientemente la enfermedad y generar epidemia (Díaz – Pulgarín, 1989).

Salazar *et al.*, (2000), mencionó que para la transmisión de PYVV se necesitan adultos de moscas blancas que adquieren el virus de plantas sintomáticas durante periodos de 6 horas. Mientras que la inoculación se obtiene en periodos de alimentación mínimo de 30 minutos. Aparentemente no existe un periodo de incubación de PYVV en el vector y el virus no es retenido por más de 6 horas.

De acuerdo a Zapata *et al.*, (2004), la mosca blanca necesita al menos una hora de exposición (exploración y alimentación) sobre una planta de papa enferma para poder adquirir el virus, pero a medida que aumenta el tiempo de exposición, también se amplía la eficiencia en la transmisión del virus (Brown, 2002; Zapata *et al.*, 2004). Así mismo menciona, que una vez que la mosca blanca adquirió el virus, se demora por lo menos una hora de exposición sobre la planta de papa sana para transmitir el patógeno. La permanencia del virus en la mosca blanca o el tiempo que permanece virulífero es de seis días aproximadamente, y los síntomas pueden manifestarse a los doce días.

De acuerdo a la investigación desarrollada por Duffus (2001), se determinó los siguientes periodos de adquisición e inoculación para algunos Crinivirus transmitidos por *T. vaporariorum* como se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1:** Características de la transmisión de algunos Crinivirus por *T. vaporariorum*.

<b>Virus</b>	<b>Eficiencia de Transmisión (1 – 40 insectos)</b>	<b>Umbral de Adquisición (1 – 6 horas)</b>	<b>Umbral de Inoculación</b>	<b>Persistencia en el vector</b>
<b>BPYV</b>	10 – 83.3 %	4.2 – 70.8 %	8.3 – 95.7 % (1 – 6 horas)	6 días
<b>TICV</b>	8 – 83 %	6 – 94 %	16 – 80 % (1 – 48 horas)	3 días
<b>ToCV</b>	0 – 28 %	No determinado	6 – 72 % (1 – 24 horas)	< 1 día

FUENTE: Duffus, 2001.

Además, Duffus (2001) agrega que, las pruebas para la eficiencia de transmisión involucran moscas blancas avirulíferas que se alimenten de las plantas infectadas con el virus, ya sea individualmente o en grupos de 5, 10, 20 o 40 insectos por hoja, por un periodo de acceso a adquisición de 24 horas y luego transferirlos a plantas indicadoras de inoculación apropiados para probar la transmisión del virus. Las plantas de la prueba de inoculación deben ser jóvenes y generalmente con tres a cuatro hojas. Mientras que las plantas fuente de virus también deben estar en buenas condiciones, y que están empezando a mostrar síntomas, generalmente de 2 a 4 semanas post-inoculación según la época del año y la calidad de la luz.

Gamarra *et al.*, 2010, realizó un experimento para observar la eficiencia de transmisión del *Sweet potato chlorotic stunt virus* mediante sus vectores *Bemisia afer* sensu lato y *Bemisia tabaci* biotipo B, a dos temperaturas constantes de 20 y 25 °C; obteniendo un nivel bajo en la eficiencia de transmisión a través del empleo de un adulto como transmisor en ambas especies *B. afer* (6 a 13 %) y *B. tabaci* (7 a 13.1 %); obteniéndose una mayor eficiencia de transmisión en la temperatura de 25 °C que en la de 20 °C, sin embargo se observó, que *B. afer* es más eficiente cuando transmite el virus SPCSV de forma aislada, que cuando está en sinergismo con otros virus como SPFMV, y lo inverso ocurre con *B. tabaci* biotipo B.



Otros Crinivirus como el *Sweet potato sunken vein virus* (SPSVV) es transmitido por las moscas blancas *Bemisia tabaci* biotipo B y *Trialeurodes abutilonea* de forma semipersistente, requiriendo un tiempo mínimo de 1 hora para la adquisición e inoculación, llegando a un máximo de 24 horas para ambos periodos (Gamarra, 2002, 2010).

### **2.2.5. Detección del virus PYVV**

Cuando los virus infectan las plantas, pueden o no inducir síntomas. Si los síntomas son producidos en las plantas infectadas, éstos pueden tener un valor en el diagnóstico, sin embargo, la sintomatología no es considerado un método tan preciso en el diagnóstico de la presencia de un virus, por cuanto solo la experiencia puede indicar cuándo es conveniente usarla (Salazar, 1995, citado por Gil, 2010).

Las pruebas más confiables para determinar la presencia de un virus en una planta se obtienen a través de la observación del virus al microscopio electrónico, las técnicas serológicas y las técnicas moleculares (RT - PCR) (German-Retana, 1999; Arciniegas, 2003; Zapata *et al.*, 2004; Wintermantel, 2008).

### **Técnicas Moleculares**

Las técnicas basadas en el uso de ácidos nucleicos han permitido a los investigadores superar las desventajas que presentan las técnicas dependientes de la interacción antígeno-anticuerpo (Técnicas serológicas), en particular los problemas asociados a su posible inespecificidad y sobretodo que no existe aún un anticuerpo para el virus PYVV. Una ventaja de los métodos basados en el uso de ácidos nucleicos es, la alta precisión que ofrecen para la detección viral, así como su uso simultáneo para la caracterización genética de los virus en estudio e incluso de su interacción con el hospedero. Estos métodos se dividen básicamente en dos grupos: hibridación de ácidos nucleicos (ADN/ARN) con marcaje usando fosforo 32 ( $P^{32}$ ) (Gamarra, 2002) y aquellos que emplean la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Shcherbakova, 2007; citado por Gil, 2010).

#### - **Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se fundamentan en la amplificación exponencial de una secuencia de ácidos nucleicos que es flanqueada por un par de iniciadores, los cuales son usados por una polimerasa termo estable de ADN para la formación de las nuevas cadenas. La técnica consta de múltiples ciclos (usualmente 35 a 40) en los cuales hay desnaturalización de ADN de doble cadena (ADNdc), anillamiento de los cebadores (oligonucleotidos de 16 a 35 bases), extensión (polimerización) y nuevamente desnaturalización. Esto permite la detección precisa de una secuencia viral y posterior secuenciación para caracterizarla con exactitud (Arciniegas, 2003; Gil, 2010; Hoy, 2013).

En la aplicación de este método, el ADNdc se calienta alrededor de 95 °C para separar las hebras en presencia de los iniciadores. Cuando la temperatura se reduce a una temperatura apropiada (generalmente entre 36 y 60 °C), los iniciadores hibridan con el ADN en la región de complementariedad. Luego, la polimerasa extiende los iniciadores para copiar el ADN y ciclos sucesivos que comprenden la desnaturalización del ADN molde, la hibridación de los iniciadores y su extensión por la polimerasa. Esto da lugar a la acumulación exponencial de una región específica cuyos terminales están definidos por los terminales 5' de los iniciadores (Gil, 2010; Hoy, 2013). La repetición de varios ciclos desnaturalización-hibridación-extensión (de 20 a 40 ciclos) conduce a una acumulación exponencial del ADN. La sucesión de estas etapas ha sido automatizada en un termociclador gracias a que la TAQ polimerasa (extraída de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*) es resistente a temperaturas elevadas (Box, 1999, citado por Arciniegas, 2003). La combinación del método de la transcripción reversa con PCR hace posible la amplificación de ARN viral, el cual generalmente se presenta en baja concentración en los tejidos del hospedante.

#### - **Retrotranscripción y ampliación enzimática (RT-PCR)**

Se utiliza para detectar un virus cuyo genoma es un ARN, como es el caso de PYVV. Previamente a la PCR se incluye una etapa durante la cual el ARN es transcrito a su ADN complementario (ADNc) con la ayuda de una transcriptasa inversa (Hoy, 2013). Inicialmente la RT-PCR para PYVV se basó en una técnica desarrollada para el virus de la tristeza de los

cítricos que también pertenece a la familia Closteroviridae utilizando iniciadores para la detección del gen de la HSP70 (Salazar, *et al.*, 2000; Gil, 2010).

En resumen, el proceso de RT-PCR implica:

1. Aislamiento del ARN viral (total)
2. Transcripción en reversa del ARN viral a ADNc
3. Amplificación del ADNc por la ADN polimerasa (PCR)

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Ubicación del experimento**

##### **3.1.1. Lugar**

El trabajo se llevó a cabo en el año 2015, en dos áreas del Centro Internacional de la Papa (CIP), ubicadas en La Molina - Lima (LS 12° 4' 34'', LO 76° 56' 46'' y 244 m.s.n.m):

- Laboratorios de la Unidad de Virología en cuyas áreas se realizaron los análisis moleculares.
- El invernadero y cobertor de la Unidad de Virología del CIP, donde se realizó la crianza del vector, el mantenimiento de la planta fuente de PYVV y la siembra y mantenimiento de las plantas de cada tratamiento.

##### **3.1.2. Clima**

La zona de La Molina presenta las condiciones climáticas típicas de costa central, con un clima templado cálido perteneciente a la zona árida central. El invernadero estuvo acondicionado para mantener una temperatura entre los 22 a 23 °C y 80 % de humedad relativa, mientras que el cobertor mantuvo las mismas condiciones climáticas que el de la zona (La Molina).

#### **3.2. Metodología**

Las temperaturas-tratamiento empleadas para determinar la eficiencia de transmisión del virus PYVV fueron: 12 °C, 15 °C, 18 °C, 20 °C y 25 °C, las que se mantuvieron constantes durante:

- El Periodo de Acceso a Adquisición (PAA- apartado 3.2.5)

- El Periodo de Acceso a Inoculación (PAI- apartado 3.2.6)
- El desarrollo de la planta positiva (fuente del virus) desde su inicio de siembra hasta el día final del PAA.

### **3.2.1. Crianza de la mosca blanca *T. vaporariorum***

Las colonias de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) empleados provienen de aislamientos de colectas de pupas encontrada en hojas de la planta *Lantana* sp. ubicadas en el CIP - La Molina, las cuales fueron seleccionadas morfológicamente con ayuda del estereoscopio para tener seguridad de obtener pupas de la especie y evitar colectas de pupas parasitadas o de otras especies de mosca blanca.

Para la crianza de insectos se utilizaron jaulas de madera de dimensiones 76.5 x 41 x 52 cm acondicionadas con dos mangas de tela (Figura 2a y 2b), donde se sembraron tubérculos de *Solanum tuberosum* Clon Walter Amoros (CIP-W.A.077/397077.16) en macetas de 5'' como fuente de alimento, las cuales se sembraron de forma escalonada (dos plantas cada 4 días) para mantener una población constante de pupas disponibles para el momento del aislamiento de la colonia joven (Figura 2c). Se realizó constantes chequeos para evitar el ingreso de algún otro insecto plaga o de alguna enfermedad.

### **3.2.2. Aislamiento de la colonia joven de *T. vaporariorum***

Se instaló una jaula acrílica (30 x 30 x 35 cm) con una planta de *Solanum tuberosum* Clon W.A, para aislar las pupas provenientes de las jaulas matrices, proporcionando una colonia joven de la misma edad. Uniformizando de esta manera la edad de los adultos al momento de la adquisición del virus (Figura 2e).

Se colectaron las hojas con mayor cantidad de pupas (hojas basales y medias) que estuvieron más cerca a la eclosión, y se mantuvieron hidratados en pequeños viales de vidrio acaramelados para que puedan darle tiempo a que emerjan los adultos y colonicen la nueva planta (Figura 2d). Se mantuvo esta colonia hasta el momento de obtener la mayoría de pupas emergidas, para luego usar los adultos en el proceso de adquisición del virus (Figura 2f).

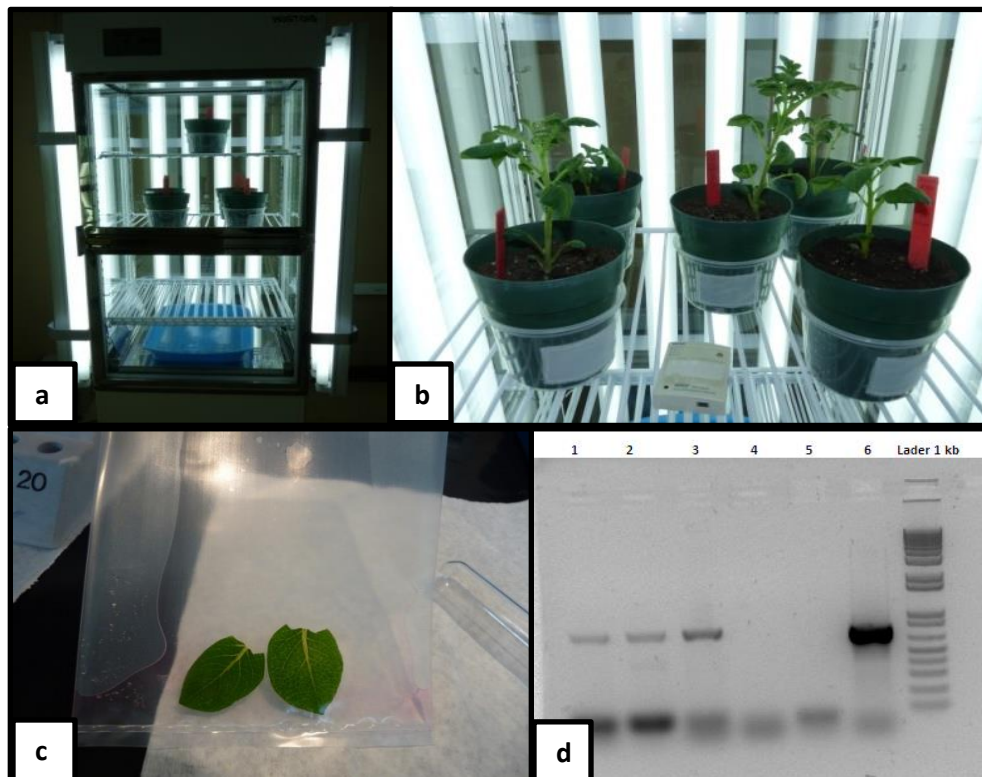


**Figura 2:** a y b) Jaula de madera con dos mangas para crianza de insectos; c) Mantenimiento de adultos de mosca con plantas de papa; d) Pupas colectadas; e) Planta de papa con adultos jóvenes o recién emergido; f) Adultos jóvenes emergidos.

### 3.2.3. Instalación de plantas positivas como fuente del virus PYVV

Se sembraron entre 3 a 5 tubérculos provenientes de plantas positivas de *Solanum tuberosum* var. Canchan INIA (CIP 380389.1) infectadas con el virus PYVV (confirmada por test RT-PCR) en macetas de 5'' y se instalaron en una cámara de crecimiento bioclimática (BIOTRON), que estuvo previamente acondicionado a la temperatura correspondiente de cada tratamiento (Figura 3a y 3b).

Se regó periódicamente, y se mantuvo además una bandeja con agua en el interior de cada BIOTRON para mantener una humedad constante (> 80 %). Luego de 15 a 25 días aproximadamente de su siembra (dependiendo de la temperatura-tratamiento, a mayor temperatura menor número de días), se extrajeron hojas de las plantas-fuente en una bolsa de polietileno (una hoja de la zona apical y otra de la zona media) para la confirmación de la presencia de virus mediante pruebas de RT-PCR (Figura 3c y 3d).



**Figura 3:** a: siembra de plantas positivas en BIOTRON, b: plantas positivas a los 15 días de desarrollo, c: extracción de muestras para confirmación de virus, d: electroforesis de material obtenido después del RT-PCR y PCR

### 3.2.4. Instalación de plantas libre de virus para inoculación del virus PYVV

Las plantas de *Solanum tuberosum* Clon W.A libre de virus (100 repeticiones) que se usaron para cada temperatura-tratamiento se sembraron luego de 10 días después de siembra de las plantas-fuente del virus, en macetas de 5'', y se mantuvieron en invernadero hasta el día de la inoculación del virus (Figura 4).



**Figura 4:** Plantas libre de virus en invernadero a los 5 días después de siembra.

### 3.2.5. Adquisición del virus por el vector *T. vaporariorum*

Una vez confirmada la presencia del virus en la planta-fuente, se procedió a la infestación de esta con adultos de mosca blanca provenientes de la colonia joven. Se emplearon microjaulas elaboradas de 10 cm de diámetro y 2 cm de altura con tres agujeros de 1.5 cm de diámetro; y se colectaron los adultos de mosca blanca de la colonia joven de forma mecánica mediante el empleo de viales, que fueron insertados en las microjaulas permitiendo la liberación de los adultos en las hojas seleccionadas de la planta-fuente (parte apical y media) (Figura 5a), y se selló herméticamente con parafilm para evitar la salida de los adultos (Figura 5b y 5c).

El PAA tuvo un periodo de 48 horas de acuerdo a la metodología empleada por Díaz y Pulgarín (1989) y por Gamarra *et al.*, (2010), que demostró mejores resultados con este periodo de adquisición.



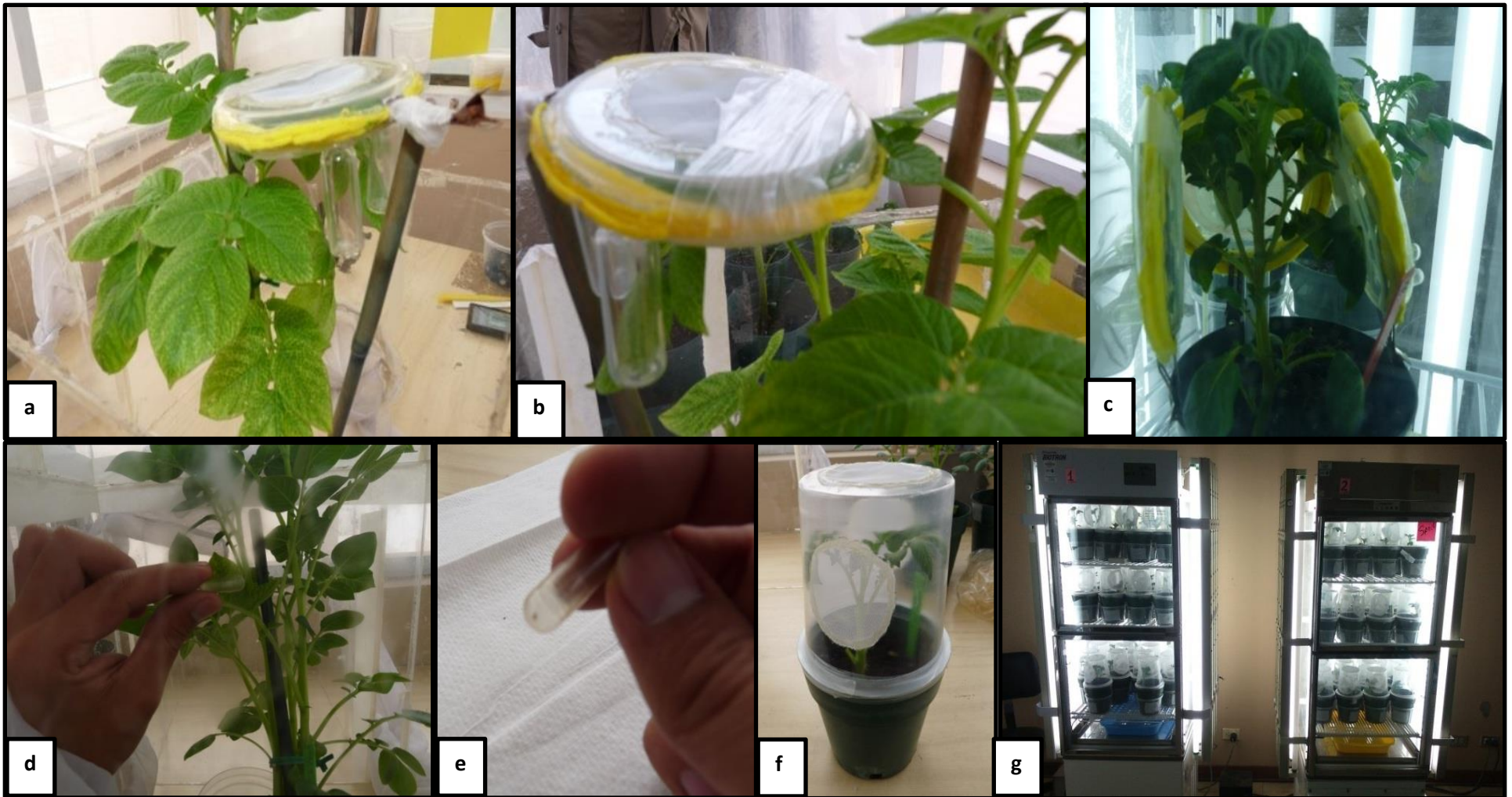
### **3.2.6. Inoculación del virus por el vector *T. vaporariorum***

Luego de finalizado el periodo de adquisición del virus, se procedió a infestar cada planta de *Solanum tuberosum* Clon W.A libre de virus con un adulto de mosca blanca virulífero (Figura 5d y 5e), debido a que se obtuvo éxito en la transmisión empleando un individuo según los resultados de Díaz y Pulgarín (1989) y Gamarra *et al.*, (2010), por lo que se empleó esta cantidad para determinar la eficiencia del adulto como vector del virus.

Posteriormente de la infestación de las plantas libre de virus, estas se cubrieron con un vaso de plástico de 1L de capacidad que tuvieron un agujero de 6.5 cm en la parte inferior y dos agujeros de la misma dimensión en los lados laterales, sellados con una malla organza para ayudar en la ventilación de la planta y del insecto, y se cerró herméticamente con parafilm para evitar la salida del adulto (Figura 5f).

Se acondicionó previamente las cámaras bioclimáticas (BIOTRONES) a la temperatura en evaluación, y se dio inicio al PAI con un periodo de 72 horas (Figura 5g); el cual demostró mejores resultados en la metodología empleada por Díaz y Pulgarín (1989) y Gamarra *et al.*, (2010). Al término del PAI se procedió a colectar los adultos para realizar posteriormente una prueba de RT-PCR para confirmación de la retención del virus en el grupo de adultos.

Luego se ubicaron las plantas en el invernadero que estuvo acondicionado a una temperatura entre 22 a 23 °C, hasta el término de su ciclo fenológico (Figura 6a).

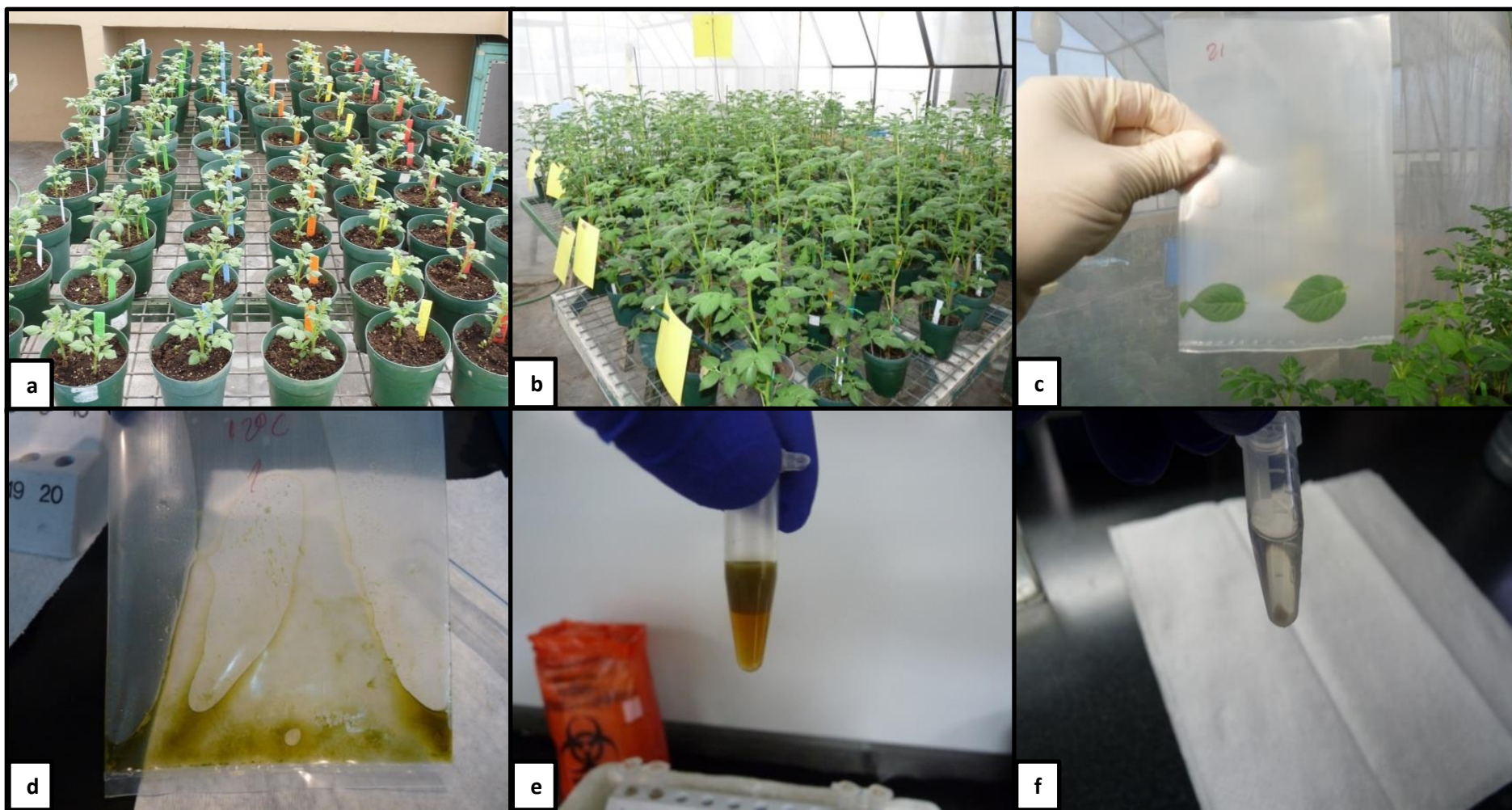


**Figura 5:** a: adultos de mosca blanca colectados en viales, b: sellado hermético, c: selección de hojas del tercio medio y superior; d y e: colección de un adulto de mosca blanca virulífera, f: infestación en planta sana libre de virus, g: Traslado de plantas infestadas a los BIOTRONES por un PAI de 72h.

### **3.2.7. Confirmación de éxito de transmisión**

Luego de los 30 días después del PAI se procedió a la extracción de hojas de las repeticiones de forma similar a la extracción de hojas de las plantas-fuente (Figura 6d, 6e y 6f). Posteriormente con el producto final de la extracción (Anexo 1) se procedió a la prueba de RT-PCR (Anexo 3). Finalmente, con el producto final del RT-PCR se realizó una electroforesis para su lectura final mediante luz UV (Anexo 4), donde se pudo observar la banda del ADN viral (entre los 750 a 800 pb para el caso de PYVV) en los casos donde hubo éxito en su transmisión.

Simultáneamente se observó y registró la sintomatología del virus en las plantas ubicadas en el invernadero.



**Figura 6:** a) reubicación de las plantas en el invernadero luego del PAI; b) plantas a los 30 del PAI; c) extracción de hojas en cada repetición; d, e y f: proceso de extracción y purificación de ácidos nucleicos.

### **3.2.8. Transmisión seriada a temperatura fluctuante**

Se realizó una transmisión seriada para observar la retención del virus por su vector, que consistió en inoculaciones sucesivas en diferentes plantas sanas por día (durante 10 días) empleando el mismo vector virulífero. El cual se realizó en el cobertor ubicado en las instalaciones del CIP a temperatura fluctuante.

Se sembraron entre 2 a 3 plantas-fuente en macetas de 5'' y se ubicaron dentro del cobertor (Figura 7a). A los 10 días después de la siembra de la planta-fuente se sembraron las plantas libres de virus de forma escalonada (7 plantas por día durante 10 días) (Figura 7b). Luego de los 15 días de siembra de las plantas-fuente, se realizó la confirmación de presencia de virus por RT-PCR de las plantas-fuente. Una vez confirmada la fuente del virus, se procedió al PAA por 48 horas.

Transcurrido el PAA, se infestaron 6 plantas libre de virus con un adulto virulífero por planta, y un control negativo (1 adulto libre de virus). Se dio inicio al PAI por un periodo de 24 horas (Figura 7d). Al término del PAI, se extrajeron las moscas adultas y se colocaron en una nueva planta libre de virus por 24 horas más, incluyendo el control negativo, y así sucesivamente durante 10 días. A los 30 días después del PAI se realizó la confirmación de presencia de virus por RT-PCR (Figura 7e).

- Este experimento tuvo tres repeticiones distribuidos en tres épocas del año:
  - Febrero – Abril: 1ra Temperatura Fluctuante
  - Mayo – Junio: 2da Temperatura Fluctuante
  - Julio – Agosto: 3ra Temperatura Fluctuante



**Figura 7:** a: plantas positivas después de 15 días de siembra; b: siembra de plantas sanas para las repeticiones de transmisión seriada; c: plantas libres de virus a los 7 días después de siembra; d) 1er PAI de la transmisión seriada; e) Repeticiones de transmisión seriada a los 30 días del PAI.

### 3.2.9. Experimento adicional: Prueba de inoculación con 50 adultos de *T. vaporariorum*

Se realizó una prueba adicional en cada temperatura-tratamiento, que consistió en la infestación de 10 plantas sanas con 50 adultos virulíferos por temperatura, y se procedió con el mismo proceso que los tratamientos con un solo adulto (apartado 3.2.5 – 3.2.7). Además, se realizó una transmisión seriada en temperatura fluctuante con 50 adultos, procediendo con misma metodología que de la transmisión seriada con 1 insecto (apartado 3.2.8).

### 3.2.10. Procedimiento para el modelamiento de los datos obtenidos

Los datos fueron analizados con el Software ILCYM 3.0 utilizando el paquete estadístico del programa R (3.3.1).

Se desarrolló un sub modelo en ILCYM para determinar la dependencia de la temperatura en la eficiencia de transmisión del virus. Posteriormente se utilizó este sub modelo basado en el proceso de transmisión con parámetros y funciones matemáticas para vincular la eficiencia de la transmisión del virus con el modelo de la fenología del insecto el cual fue desarrollado en estudios previos por el CIP por Gamarra (2016).

La transmisión es evaluada por cada adulto de una muestra  $n_j$  de la  $j$ -ésima temperatura  $T_j$ , considerándose entonces como una variable dicotómica  $y_{ij}$ , con valores de 1 para la ocurrencia y 0 para la ausencia, del  $i$ -ésimo insecto en la  $j$ -ésima temperatura, para obtener la frecuencia absoluta o número total de insectos que transmitieron por cada temperatura  $\sum_i^n y_{ij}$ , y finalmente obtener el porcentaje de transmisión de la siguiente forma:

$$y_{ij} = \begin{cases} 1: \text{Hubo transmisión del virus} \\ 0: \text{No hubo transmisión del virus} \end{cases}$$

$$p_j = \frac{\sum_i^n y_{ij}}{n_j}$$

$$i = 1, 2, \dots, n$$

$$j = 1, 2, \dots, q$$

Entonces por cada temperatura constante evaluada ( $T$ ) se tendrá el valor de un porcentaje de

transmisión ( $p$ ), donde la temperatura es la covariable o variable independiente, mientras que el porcentaje de transmisión es la variable objetivo o dependiente; dicha relación estará representada por una función de forma no lineal (generalmente se trabaja con funciones no lineales utilizadas en el modelamiento de la tasa de desarrollo, generados en el software ILCYM):

$$\text{Sub Modelo (ILCYM): } f(T) = p$$

Para estimar la supervivencia se usaron las funciones estimadas de la mortalidad de cada estado inmaduro:  $m_{Egg}(T)$ ,  $m_{Larvae}(T)$ ,  $m_{Pupae}(T)$ , obtenidas de la fenología de la plaga ya establecidos en ILCYM en estudios previos (Gamarra, 2016), entonces la función de supervivencia se compone de la siguiente manera:

$$g(T) = s = 1 - \left(1 - \left(1 - m_{Egg}(T)\right) * m_{Larvae}(T)\right) * m_{Pupae}(T)$$

La siguiente función no lineal representa uno de los estados inmaduros (Gamarra, 2016):

$$\text{Modelo Wang 1: } m_{Egg}(T) = 1 - \frac{1}{e^{\left(1+e^{-\frac{(T-Top)}{B}}\right)} * \left(1+e^{-\frac{(Top-T)}{B}}\right)^* H}$$

Parámetros del modelo:  $Top$ ,  $B$ ,  $H$

Mientras que para estimar la oviposición total, esta se extrae también de la fenología de la plaga generado en ILCYM (Gamarra, 2016), y se representa de la siguiente manera:

$$\text{Modelo Taylor: } q(T) = o = 1 - rm * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{(T-Top)}{Troh}\right)^2}$$

Parámetros del modelo:  $rm$ ,  $Top$ ,  $Troh$



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este apartado para su mejor redacción y entendimiento, la información será presentada en la siguiente secuencia; primero los resultados experimentales seguidos de su discusiones y de su aplicación mediante modelos ILCYM.

### 4.1. Transmisión del virus PYVV usando un individuo como vector

El vector *Trialeurodes vaporariorum* llego a transmitir el virus PYVV en diferentes grados dentro de las temperaturas evaluadas. Teniendo un rango de eficiencia de transmisión individual desde 3 % hasta 64 % en las temperatura-tratamiento de 25 °C y 15 °C respectivamente (Cuadro 2). Estos porcentajes fueron obtenidos de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de RT-PCR (Anexo 6), donde se consideraron como positivos (planta infectada) las bandas que presentaban el peso molecular del virus que va entre 750 a 800 pb (Livieratos *et al.*, 2004; Gil, 2010).

**Cuadro 2:** Porcentaje de transmisión del Virus del amarillamiento de las venas de la papa (PYVV) por *T. vaporariorum* a 5 temperaturas constantes.

<b>Tratamiento</b>	<b>Plantas infectadas (confirmadas por RT-PCR)</b>	<b>Porcentaje de Transmisión</b>	<b>Plantas con síntomas</b>
<b>12°C</b>	<b>14/100</b>	<b>14 %</b>	<b>0/100</b>
<b>15°C</b>	<b>64/100</b>	<b>64 %</b>	<b>3/100</b>
<b>18°C</b>	<b>4/100</b>	<b>4 %</b>	<b>0/100</b>
<b>20°C</b>	<b>4/100</b>	<b>4 %</b>	<b>0/100</b>
<b>25°C</b>	<b>3/100</b>	<b>3 %</b>	<b>0/100</b>

Asimismo, en el Cuadro 2 se reafirma la característica asintomática que tiene PYVV, observándose que a pesar de llegar hasta un 64 % de plantas infectadas en el tratamiento de 15 °C, solo un 3 % de ellas mostraron los síntomas característicos de la infección, confirmándose la característica asintomática de este virus (Salazar *et al.*, 2000; Zapata *et al.*, 2004). En las repeticiones donde se pudo observar los síntomas (15 °C), estos tuvieron un tiempo de 17 a 33 días en manifestar los síntomas característicos del virus, lo cual está dentro del rango mencionado por Díaz y Pulgarín (1989), que va desde los 10 días hasta los 60 días, con una media de 19 días; y según Zapata *et al.* (2004) se puede manifestar tempranamente a los 12 días.



**Figura 8:** Sintomatología típica de PYVV observada en una de las repeticiones de la temperatura-tratamiento de 15 °C.

Una vez obtenido los porcentajes de transmisión en cada temperatura-tratamiento, se procedió a generar el modelo de transmisión en ILCYM. Representándose de la siguiente forma:

$$f(T) = p$$

$T$  : Temperatura (12, 15, 18, 20 y 25 °C)

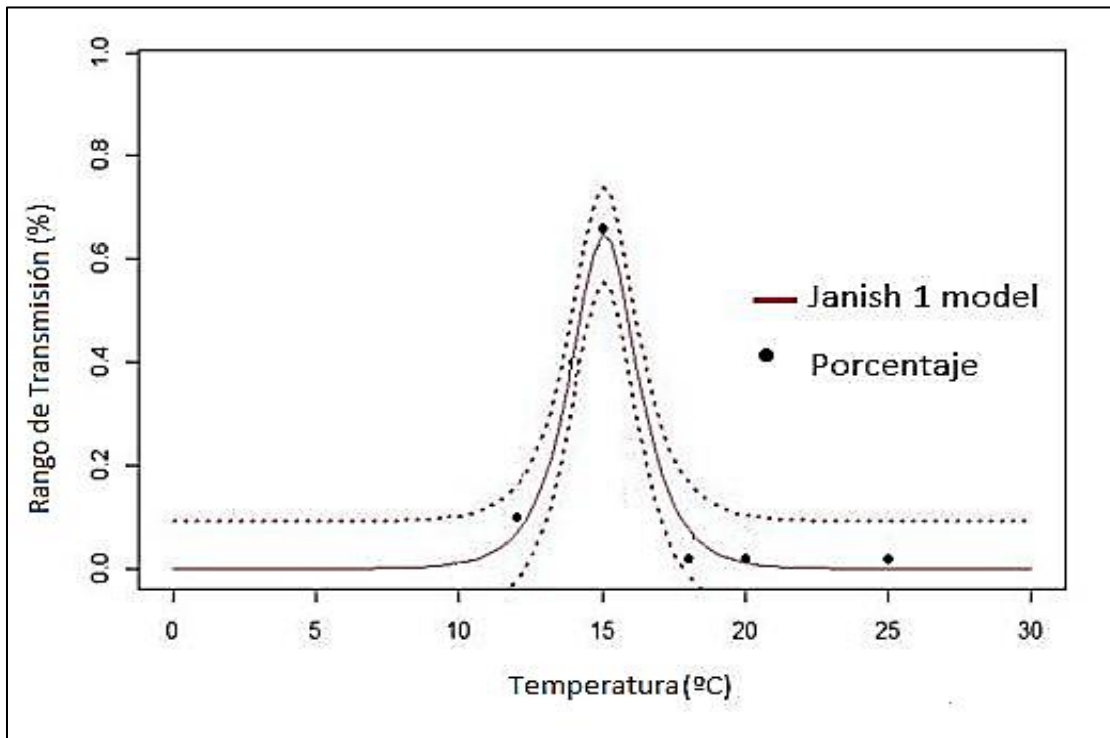
$p$  = porcentaje de transmisión

Modelo ILCYM para la transmisión obtenida:

$$f(T) = \frac{2}{D_{\min}(e^{K(T-T_{opt})} + e^{-K(T-T_{opt})})}$$

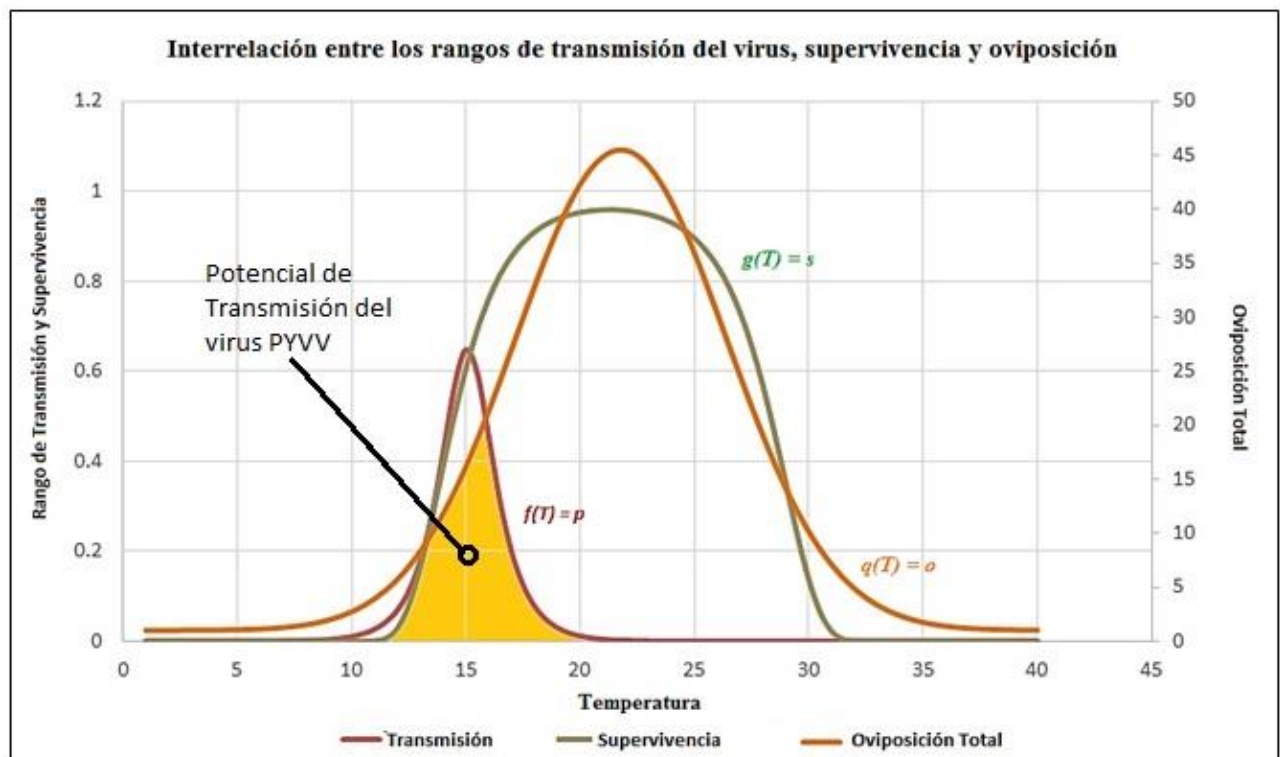
Parámetros del modelo:  $D_{\min}$ ,  $K$ ,  $T_{opt}$

El Modelo se puede ver graficado de la siguiente manera:



**Figura 9 :** Curva del Modelo de Transmisión del virus PYVV empleando un individuo de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en función a la temperatura.

Una vez obtenido el modelo que representa la eficiencia de transmisión del virus en función a la temperatura (*función f*), se pudo complementar con los modelos basados en el ciclo de vida del insecto como la tasa de supervivencia y tasa de ovoposición (*funciones g y q*) determinados en estudios previos llevados a cabo por Gamarra (2016), empleando de igual forma el software ILCYM. Se interrelacionaron las 3 funciones (sub modelos) donde se muestra diferentes temperaturas óptimas para la transmisión de virus y el desarrollo del insecto (Figura 10).

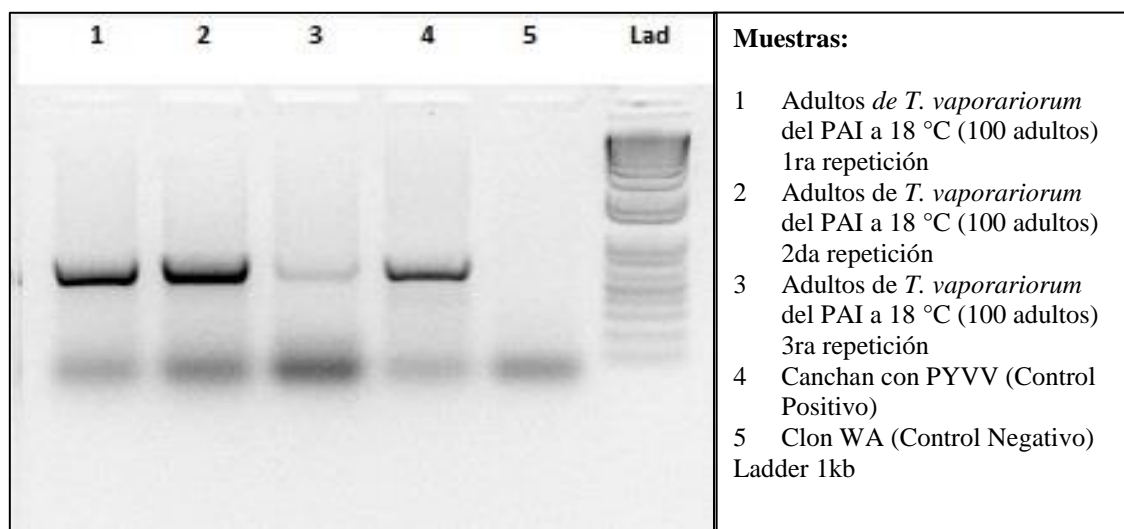


**Figura 10 :** Interrelación entre los modelos de trasmisión del virus PYVV, supervivencia y oviposición total para *T. vaporariorum* en función a la temperatura.

En la Figura 10, el área remarcada en amarillo entre las curvas refleja el potencial de transmisión del virus en relación con los rangos mínimos y máximos de supervivencia y ovoposición de *Trialeurodes vaporariorum* en función a la temperatura. Se puede observar que la mayor eficiencia de transmisión se da a 15 °C, con un 64 % de éxito en la transmisión;

que es cuando el insecto alcanza un porcentaje de supervivencia de 60 %, lo cual es un indicativo que a temperaturas bajas el insecto puede tener un desarrollo cerca de lo normal y un alto grado de eficiencia de transmisión, pudiéndose encontrar estas condiciones favorables en zonas templadas. Pero a la vez es desfavorable para la ovoposición total del insecto que llega a un porcentaje bajo (17 %), lo cual afectaría en la diseminación de las poblaciones del vector.

Adicionalmente, se realizó una prueba molecular en el grupo de adultos de mosca blanca virulíferos (100 adultos) empleados en cada temperatura-tratamiento para constatar la presencia del virus dentro de cada grupo, dando como resultado la confirmación de la presencia del virus dentro de todos los grupos, pero sin saber con exactitud cuáles de los 100 individuos adquirieron el virus, ya que se necesita una muestra numerosa de adultos para la extracción del ARN, y posteriormente, el producto final sea suficiente para las posteriores pruebas moleculares de acuerdo a los protocolos establecidos.



**Figura 11:** Detección del virus PYVV en adultos de *T. vaporariorum* recolectados luego del PAI en la temperatura-tratamiento de 18 °C

Este estudio proporciona datos experimentales que demuestran que la transmisión de PYVV por adultos individuales de *T. vaporariorum* resulta en un vector relativamente eficiente del virus PYVV. Gamarra *et al.* (2010), Wintermantel (2010) y Wisler (2006) observaron que sólo los vectores más eficientes eran capaces de transmitir las especies de Crinivirus tal como se observó con el virus del enanismo clorótico del camote (SPCSV) y el virus de la clorosis del tomate (ToCV) por las moscas blancas de forma individual. También se ha observado que la eficiencia de transmisión del ToCV, el virus de los amarillamiento infeccioso de la lechuga, el virus pseudo-amarillento de la remolacha (BPYV) y el PYVV están influenciados por el número de individuos utilizados para inocular las plantas de ensayo (Ng, J.C.K. *et al.* 2006, Wintermantel *et al.*, 2006; Gamarra 2002).

Gamarra *et al.*, (2010), realizó un estudio similar con el virus *Sweet potato chlorotic stunt virus* para observar la eficiencia de transmisión mediante sus vectores *Bemisia afer* sensu lato y *Bemisia tabaci* biotipo B, bajo dos temperaturas constantes de 20 y 25 °C; obteniendo un nivel bajo de transmisión a través del empleo de un adulto como transmisor en ambas especies; dando como resultado una eficiencia de transmisión de 6 a 13 % para el caso de *B. afer* a 20 y 25 °C respectivamente, y de 7 a 13.1 % de eficiencia de transmisión para *B. tabaci* a 20 y 25 °C respectivamente; siendo la temperatura de 25 °C donde se encontró un mayor éxito de transmisión del virus. Estos porcentajes de transmisión bajos tienen similitud con lo observado en la transmisión de PYVV a 20 y 25 °C, donde se hallaron porcentajes de transmisión de 4 y 3 % respectivamente, lo que nos pueda dar un indicio de que los virus tienen una mejor eficiencia de transmisión a temperaturas bajas.

Duffus (2001), evaluó la eficiencia de transmisión en otros virus transmitidos por *T. vaporariorum*, encontrando un porcentaje que va desde 0 %, 8 % y 10 % para los virus ToVC, TICV y BPVV respectivamente, mediante el empleo de 1 adulto virulífero.

#### 4.2. Transmisión seriada del virus PYVV usando un individuo como vector a temperatura fluctuante

Se realizaron 3 repeticiones en 3 épocas del año, en los cuales solo hubo éxito de transmisión en la 3ra temperatura fluctuante que se realizó en la época de invierno, como se muestra en el Cuadro 3.

**Cuadro 3:** Número de plantas infectadas con PYVV por medio de Transmisión seriada utilizando un adulto virulífero de *T. vaporariorum* en 3 épocas del año.

	<b>1ra Temperatura Fluctuante (Febrero - Abril)</b>	<b>2da Temperatura Fluctuante (Mayo - Junio)</b>	<b>3ra Temperatura Fluctuante (Julio - Agosto)</b>
<b>N° de Individuo</b>	T min promedio: 19.5 °C / T max promedio: 29.6 °C	T min promedio: 17.4 °C / T max promedio: 23.9 °C	T min promedio: 14.5 °C / T max promedio: 21.4 °C
	Plantas infectadas	Plantas infectadas	Plantas infectadas
<b>1</b>	0/10	0/10	6/9*
<b>2</b>	0/10	0/10	10/10
<b>3</b>	0/10	0/10	6/10
<b>4</b>	0/10	0/10	5/5*
<b>5</b>	0/10	0/10	8/10
<b>6</b>	0/10	0/10	5/5*
<b>7 (control negativo)</b>	0/10	0/10	0/10

\*último día de vida del adulto

Como se puede observar en el Cuadro 4 se llegó a obtener la transmisión del virus hasta el día 10 en la 3ra temperatura fluctuante, y con un mínimo de hasta 5 días para que el insecto llegue a transmitir el virus exitosamente (ANEXO 9), teniendo semejanza con lo mencionado por Arciniegas (2003), quien menciona que los Crinivirus pueden ser transmitidos por sus

vectores entre 1 a 9 días; y según Zapata *et al.* (2004) el vector permanece virulífero hasta los 6 días aproximadamente luego de haber adquirido el virus. En contraste, en lo reportado por Duffus (2001), la persistencia de los virus ToVC, TICV y BPVV en su vector *T. vaporariorum* tuvieron un rango desde 1 día, 3 días, hasta los 6 días respectivamente. Observándose que no todos los virus transmitidos por *T. vaporariorum* tienen la misma persistencia en el mismo vector. Las temperaturas registradas en la 3ra temperatura fluctuante tuvieron rangos promedio de temperatura mínima y máxima de 14.5 a 21.4 °C respectivamente; y fue la época más fría del año para la zona en evaluación. Por tanto, se observó que en la época de invierno las condiciones fueron favorables para una transmisión eficiente de PYVV por *T. vaporariorum*. Estos resultados tienen similitud en comparación con el resultado obtenido en la transmisión con temperatura constante a 15 °C.

Posteriormente, empleando el modelo generado en el software ILCYM, que se obtuvo en la transmisión con temperatura constante, se pudo obtener los siguientes resultados de simulación en la transmisión seriada con temperatura fluctuante, utilizando la temperatura promedio durante las fechas de inoculación:

- En la 1ra temperatura fluctuante se pudo observar que el rango de temperatura donde se realizó el periodo de acceso a inoculación de la primera temperatura fluctuante estuvo entre 21.9 – 24.2 °C; y al emplear el modelo de transmisión del virus PYVV obtenido, nos da como resultado una eficiencia de transmisión entre 0.087 – 0.013 %. Estos porcentajes de transmisión son muy bajos lo cual tiene una relación directa con lo que se obtuvo en campo, donde no se obtuvo ninguna planta con éxito en la transmisión seriada del virus mediante la confirmación por RT-PCR.
- En la 2da temperatura fluctuante se pudo observar que el rango de temperatura donde se realizó el periodo de inoculación de la segunda temperatura fluctuante estuvo entre 18.8 – 19.6 °C y al emplear el modelo obtenido, nos da como resultado una eficiencia de transmisión entre 2.3 – 1.1% respectivamente. Estos porcentajes de transmisión, si bien se incrementó respecto a la 1ra temperatura fluctuante, aún siguen siendo muy bajos lo cual tiene una relación directa con lo que se obtuvo en campo, donde no se obtuvo



ninguna planta con éxito en la transmisión seriada del virus mediante la confirmación por RT-PCR.

- En la 3ra temperatura fluctuante se pudo observar que el rango de temperatura donde se realizó el periodo de inoculación de la tercera temperatura fluctuante estuvo entre 15.8 – 17.1 °C y al emplear el modelo obtenido, nos da como resultado una eficiencia de transmisión entre 38.4 – 11.8% respectivamente (Cuadro 4). Estos porcentajes de transmisión si generan un mayor éxito en la transmisión del virus, en comparación con las 2 temperaturas fluctuantes anteriores. Y en consecuencia, lo obtenido en campo también demostró un alto porcentaje de transmisión, llegando hasta un 100% hasta el día 6 de la transmisión seriada y luego fue decreciendo.

**Cuadro 4:** Eficiencia de transmisión del virus PYVV en la 3ra Temperatura fluctuante (Julio - Agosto) empleando el Modelo de transmisión del virus PYVV.

Día	Fecha	Temperatura promedio en el PAI (°C)	Tamaño de muestra	Porcentaje de transmisión (%)	Número de plantas infectadas de acuerdo al Modelo	Número de plantas infectadas confirmadas por RT-PCR	Chi cuadrado $((xy)^2)/y$
1	04/07/2014	15.8	6	38.418	2	6	8
2	05/07/2014	15.9	6	33.869	2	6	8
3	06/07/2014	16.0	6	32.442	2	6	8
4	07/07/2014	16.2	6	27.197	2	6	8
5	08/07/2014	17.0	6	12.938	1	6	25
6	09/07/2014	17.1	4	11.765	0	4	0
7	10/07/2014	16.6	4	18.854	1	2	1
8	11/07/2014	16.4	4	21.666	1	1	0
9	12/07/2014	16.3	4	23.746	1	2	1
10	13/07/2014	16.2	3	26.002	1	1	0

### 4.3. Prueba adicional: Transmisión del virus PYVV empleando un grupo de individuos virulíferos como vectores

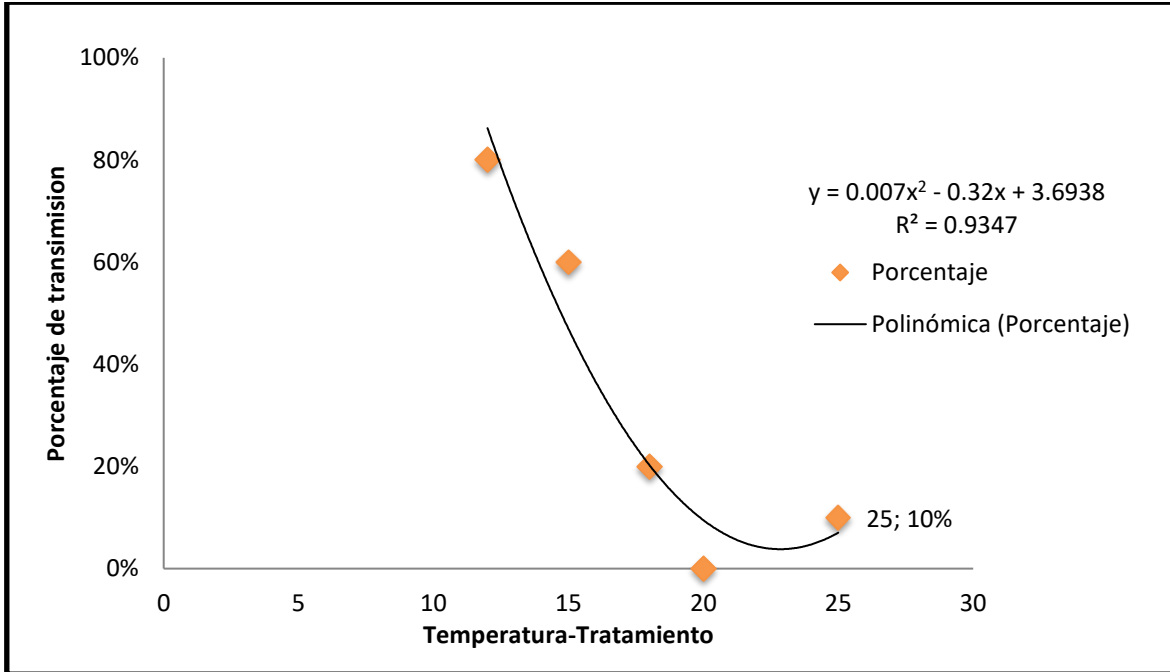
#### Transmisión con temperatura constante

El resultado obtenido al infestar una planta (10 repeticiones por temperatura) con un grupo de 50 individuos de *Trialeurodes vaporariorum* tuvo variación dentro de las temperaturas evaluadas. Teniendo un rango de eficacia desde 0 % hasta 80 % (20 °C y 12 °C respectivamente) en el éxito de transmisión (Cuadro 5). Estos porcentajes fueron obtenidos de acuerdo a la confirmación de la presencia del virus obtenido en las pruebas de RT-PCR (Anexo 8).

**Cuadro 5:** Porcentaje de transmisión a 5 temperaturas constantes utilizando 50 adultos virulíferos de *T. vaporariorum* (Westwood).

<b>Temperatura-Tratamiento</b>	<b>Plantas infectadas confirmadas por RT-PCR</b>	<b>Porcentaje de Transmisión</b>	<b>Plantas con síntomas</b>
<b>12°C</b>	<b>8/10</b>	<b>80 %</b>	<b>5/10</b>
<b>15°C</b>	<b>6/10</b>	<b>60 %</b>	<b>0/10</b>
<b>18°C</b>	<b>2/10</b>	<b>20 %</b>	<b>1/10</b>
<b>20°C</b>	<b>0/10</b>	<b>0 %</b>	<b>0/10</b>
<b>25°C</b>	<b>1/10</b>	<b>10 %</b>	<b>0/10</b>

Y obteniendo la siguiente curva :



**Figura 12:** Eficiencia de transmisión del virus PYVV empleando 50 individuos de *T. vaporariorum* virulíferos a temperatura constante



**Figura 13:** Sintomatología típica de PYVV observada en una de las repeticiones de la temperatura-tratamiento de 12 °C infestado con 50 adultos virulíferos.

En la prueba con temperaturas constantes empleando un grupo de moscas blanca virulíferas, se llegó a obtener los mayores porcentajes de eficiencia de transmisión de 80 y 60 % en las temperaturas de 12 y 15 °C respectivamente, y observándose que, al aumentar la temperatura, la eficiencia de transmisión disminuyó hasta 0 % en el caso de 20 °C y tan solo 20 % a 18 °C y 10% a 25 °C. Estos porcentajes de transmisión, tienen similitud con lo obtenido en la transmisión con un individuo virulífero a temperatura constante, donde se encontró una mayor eficiencia de transmisión en las temperaturas-tratamiento de 12 y 15 °C (14 y 64 % respectivamente) y una menor eficiencia de transmisión a 18, 20 y 25 °C (4, 4 y 3 % respectivamente).

En lo reportado por Duffus (2001), otros virus como BPYV, TICV y ToCV transmitidos por el mismo vector, tuvieron un éxito de transmisión de 83.3, 83 y 28 % respectivamente al ser inoculados con un grupo de 40 adultos virulíferos.

Los síntomas se manifestaron en mayor número de repeticiones a comparación de la transmisión individual, pero aun así hubo casos de plantas sin síntomas que se confirmaron como positivas en las pruebas moleculares (Cuadro 5). Los síntomas se presentaron desde los 14 días hasta los 37 días después del PAI, lo cual tiene mucha similitud con lo mencionado por Arciniegas (2003), que observó la aparición de síntomas entre los 28 – 32 días mediante la infestación con 100 adultos de *T. vaporariorum* virulíferos.

Además, se volvió a realizar una prueba molecular en el grupo de adultos de mosca blanca (100 adultos por muestra para extracción) de cada temperatura-tratamiento para constatar la presencia del virus dentro de cada grupo, dando como resultado la confirmación de la presencia del virus dentro de todos los grupos.

### Transmisión seriada con Temperatura Fluctuante

En la transmisión seriada utilizando 50 adultos, se llegó a tener éxito en la transmisión hasta el día 10 de inoculación, pero además de manera intermitente, ya que, en algunas de las repeticiones, no se obtuvo éxito en la transmisión (ANEXO 10).

**Cuadro 6:** Número de plantas infectadas con PYVV en transmisión seriada utilizando 50 adultos virulíferos de *T. vaporariorum* con PAI de 24 horas durante 10 días continuos.

N° de Grupo de individuos	T min promedio: 14.5 °C / T max promedio: 21.4 °C	
	Plantas infectadas (confirmadas por RT-PCR)	Plantas con síntomas
1	6/10	0/10
2	8/10	1/10
3	6/10	0/10
4	6/10	0/10
5	9/10	0/10
6	7/10	1/10
7 (control negativo)	0/10	0/10

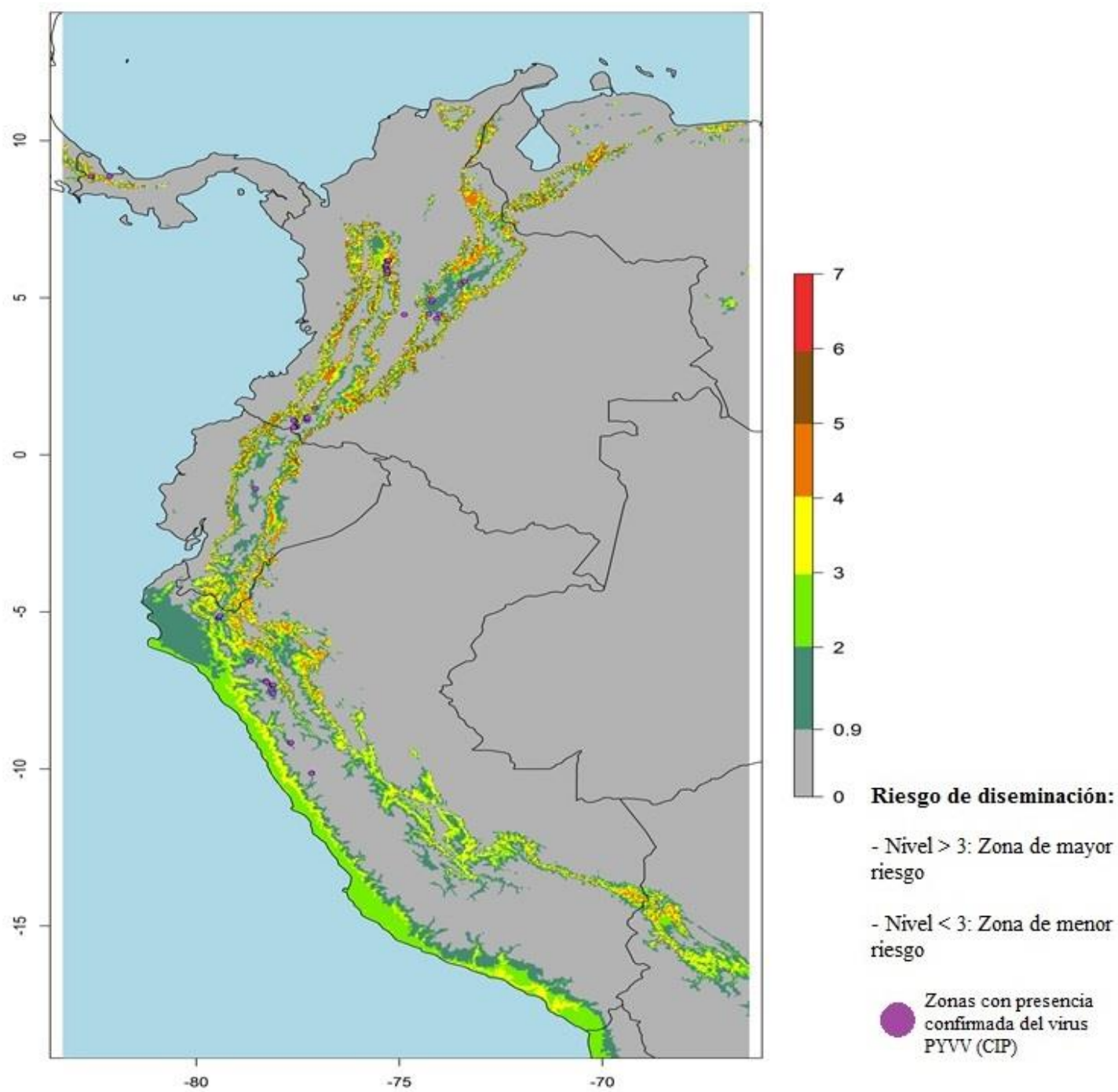
En el Cuadro 6, podemos observar que la transmisión seriada con un grupo de individuos virulíferos tuvo un éxito de transmisión de como mínimo hasta el día 6 de inoculación seriada, y en algunas repeticiones llegó hasta el día 10, teniendo nuevamente semejanza con lo mencionado por Arciniegas (2003), quien menciona que los Crinivirus pueden ser transmitidos por sus vectores entre 1 a 9 días; y según Zapata *et al.*, (2004) el vector permanece virulífero hasta los 6 días aproximadamente. Si bien la prueba se realizó en la misma temporada donde se realizó la 3ra transmisión seriada con temperatura fluctuante empleando un individuo, y en donde se obtuvo un alto porcentaje de éxito de transmisión

(hasta el día 10), también debemos agregar que la mayor cantidad de individuos virulíferos aumenta en gran proporción la probabilidad de un mayor éxito de transmisión, como se observó en esta prueba adicional. Los síntomas fueron observados en pocas repeticiones, habiendo casos de plantas sin síntomas que se confirmaron como positivas en las pruebas moleculares. Los síntomas se presentaron a los 17 días después del PAI (Cuadro 6).

#### **4.4. Resultado aplicativo del Modelo**

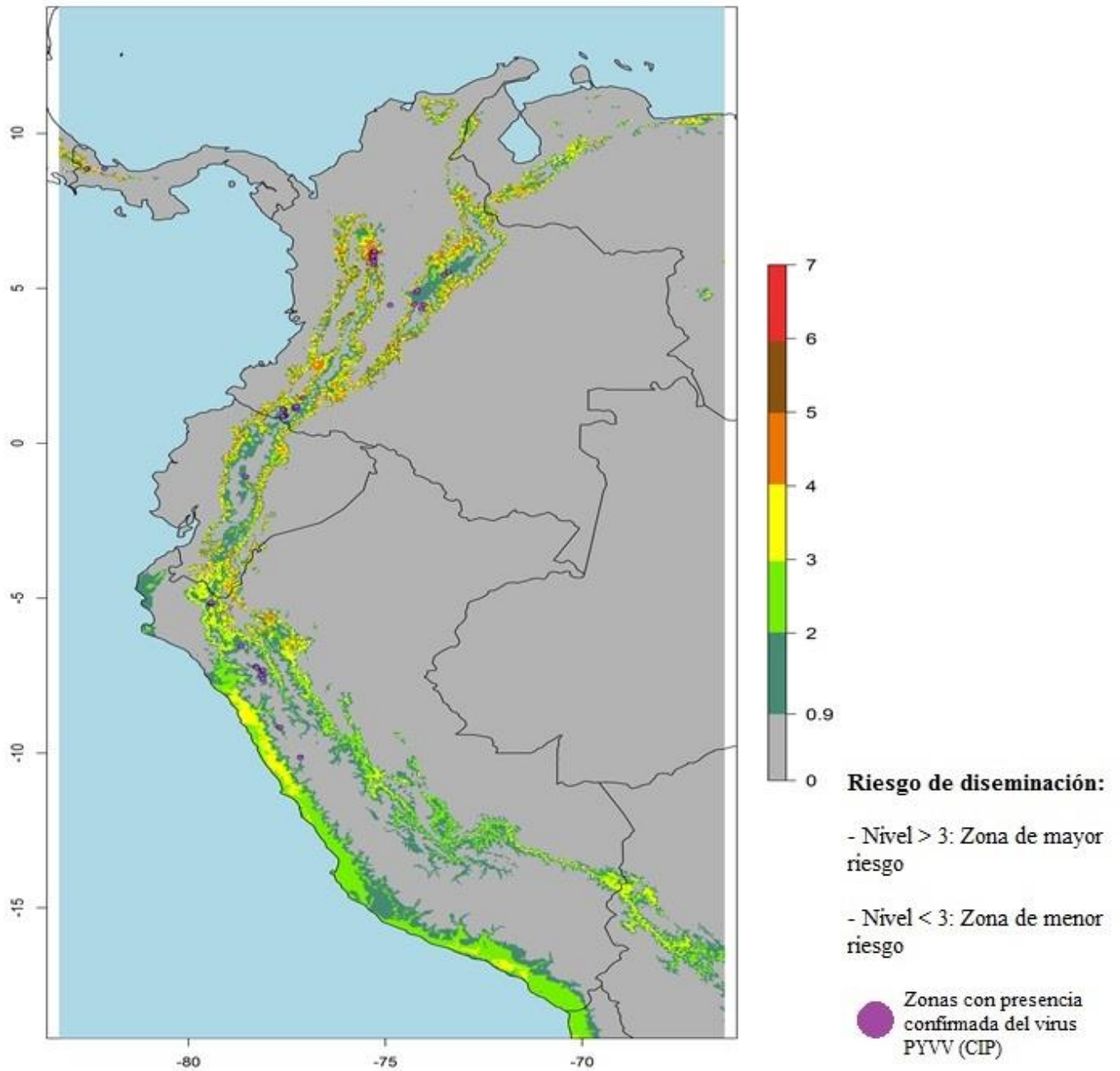
Con el Modelo obtenido en las pruebas a temperatura constante donde se determinó la eficiencia de transmisión del virus PYVV respecto a su vector *T. vaporariorum* en función de la temperatura, se puede emplear el modelo de interacción (Figura 10) de los 3 submodelos (Supervivencia, oviposición y transmisión) de forma aplicativo en el software ILCYM, para poder visualizar las zonas con riesgo potencial de diseminación del virus.

En la Figura 14, se puede apreciar que la presencia del virus PYVV confirmada en campo por el CIP (puntos morados) coincide con lo determinado por el modelo, donde se ve reflejado en las áreas del nivel 3 al 7 (mayor zona de riesgo de diseminación). Por lo tanto esto nos ayuda a validar el modelo encontrado en este estudio.



**Figura 14:** Mapa de riesgo potencial de la presencia del virus PYVV para el año 2000 empleando el modelo de transmisión del virus obtenido con el software ILCYM.

Posteriormente, también se realizó una simulación con el modelo de interacción (Figura 10) para observar el posible escenario de la diseminación del virus PYVV para el año 2050. Observándose en la Figura 15 el riesgo potencial de diseminación del virus por los posibles efectos del cambio climático.



**Figura 15:** Mapa de riesgo potencial de la presencia del virus PYVV para el año 2050 empleando el modelo de transmisión del virus obtenido con el software ILCYM



## V. CONCLUSIONES

1. Se llegó a obtener un modelo de eficiencia de transmisión del virus PYVV por su vector *T. vaporariorum* en función a la temperatura empleando un adulto virulífero, donde el porcentaje más alto de transmisión se logró a los 15 °C (64 % de eficiencia) y el punto más bajo de eficiencia fue a los 25 °C (3 % de eficiencia). Observándose que el vector *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) es un vector relativamente eficiente a diferentes temperaturas.
2. En la temperatura fluctuante y con transmisión seriada empleando un individuo virulífero, se obtuvo éxito en la transmisión en la tercera época de evaluación (época de invierno) donde la eficiencia de transmisión se obtuvo hasta el último día de inoculación (día 10), con un mínimo de 5 días. Observándose que el insecto puede permanecer virulífero por un prolongado número de días.
3. Se comprobó la presencia del virus en plantas que no presentaron síntomas. Reafirmando de esta manera el carácter asintomático del virus PYVV. La mayor cantidad de plantas con síntomas se obtuvo en la temperatura de 15 °C y tuvieron un periodo en manifestar los síntomas característicos entre 17 a 33 días después de la inoculación.
4. En la transmisión del virus con una población de 50 adultos virulíferos, se obtuvo mayor eficacia de transmisión en las temperaturas de 12 y 15 °C (80 % y 60 % respectivamente) y menor eficacia en las temperaturas de 20 y 25 °C (0 % y 10 % de respectivamente). A pesar de la mayor carga viral aportada, hubo plantas asintomáticas que adquirieron el virus (confirmadas por RT-PCR). Y en los casos donde hubo síntomas estos se manifestaron entre los 14 a 37 días del PAI.

5. En la prueba de transmisión seriada con inoculación de 50 adultos virulíferos, se llegó a obtener transmisión hasta el último día de inoculación (día 10), con un mínimo de 6 días. Manifestándose los síntomas a los 17 días (en el caso donde se llegó a presentar).
6. Se llegó a confirmar la presencia del virus en todos los grupos de poblaciones de adultos virulíferos de *T. vaporariorum* (Westwood) luego del PAI, tanto en las transmisiones individuales como en los de poblaciones.
7. El modelo obtenido sirve como una fuente de información para poder ser empleado en predicciones de las posibles zonas con riesgo potencial de diseminación del virus PYVV, ofreciendo una herramienta para poder prevenir la enfermedad en zonas donde aún no está presente.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- 1.** Comprobar la presencia del virus en los tubérculos obtenidos como cosecha en cada tratamiento para observar si existe una segregación del virus en los tubérculos producidos por cada planta.
- 2.** Realizar una prueba de transmisión separando hembras y machos para determinar su eficiencia según género.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ARCINIEGAS Basantes Nancy. 2003. Técnicas de Diagnóstico y Evaluación de Resistencia al Virus del Amarillamiento de las Nervaduras de la Papa (PYVV) en accesiones de la Colección Central Colombiana de *Solanum phureja*. Bogotá, D.C. – Colombia. pp: 10 – 30.
2. BAKER, J.R. 1996. Insectos y otras plagas de las flores y plantas del follaje. Hortitecna, Bogotá. 105 p.
3. BARRAGAN, Carlos Eduardo y Guzmán-Barney, Mónica. 2014. Molecular detection of *Potato yellow vein virus* in the natural whitefly vector *Trialeurodes vaporariorum*, Westwood. Rev. Protección Veg., vol.29, n.3, pp. 168-176.
4. BIRD Julio, Maramorosh Karl. 1978. Viruses and Virus Diseases Associated with Whiteflies. Advances in Virus Research. pp: 55 – 110.
5. BROWN Judith K., CzosnekHenryk. 2002. Whitefly transmission of plant viruses. Advances in Botanical Research.36: 65 – 76.
6. BUENO Miguel, Cardona Cesar, Chacón Patricia. 2005. Fenología, distribución espacial y desarrollo de métodos de muestreo para *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) en habichuela y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Colombiana de Entomología. 31 (2): 161 – 170.
7. CALVERT Lee A., Cuervo Maritza, Arroyave Jose A., Constantino Luis M., Bellotti Anthony, Frohlich Donald. 2001. Morphological and Mitochondrial DNA Marker Analyses of Whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) Colonizing Cassava and Beans in Colombia. Ann. Entomol. Soc. Am., 94: 512-519.
8. CARAPIA Ruiz Vicente, Castillo Gutiérrez Antonio. 2013. Estudio comparativo sobre la morfología de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. pp: 181 – 191.
9. CARDONA César, Rodríguez Isaura V., Bueno Juan M. y Tapia Ximena. 2005. Biología y Manejo de la Mosca Blanca *Trialeurodes vaporariorum* en Habichuela y

- Frijol. CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical; Department for International Development (DFID). Cali - Colombia. 50 p.
10. CORREDOR, D. 1992. Algunos aspectos sobre el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* en la Sabana de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 10 p.
  11. CUBILLOS Abello Karen. 2011. Determinación de variantes del virus del Amarillamiento de las Nervaduras de la *Solanum* spp. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá - Colombia.
  12. DIAZ, L. Marta y J. M. PULGARIN. 1989. Relaciones insecto – patógeno en el problema del “amarillamiento de las venas de la papa”. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia. 94p.
  13. DUFFUS James E., Wisler Gail C. 2001. Virus-Insect-Plant Interactions. Chapter 15: Transmission Properties of Whitefly-Borne Criniviruses and Their Impact on Virus Epidemiology. pp: 293–308.
  14. GAMARRA, H., Carhuapoma, P., Mujica, N., Kreuze, J., Kroschel, J. 2016. Greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood 1956). In: Kroschel, J., Mujica, N., Carhuapoma, P., Sporleder, M. (eds.). Pest distribution and risk atlas for Africa. Potential global and regional distribution and abundance of agricultural and horticultural pests and associated biocontrol agents under current and future climates. Lima (Peru). International Potato Center (CIP). ISBN 978-92-9060-476-1. DOI 10.4160/9789290604761-12. pp. 154-168
  15. GAMARRA H., Fuentes S., Morales FJ., Glover R., Malumphy C., Barker I. 2010. *Bemisia afer* sensu lato, a Vector of *Sweet Potato chlorotic stunt virus*. International Potato Center. La Molina, Lima – Perú.
  16. GAMARRA Heidy. 2002. Transmisión del virus del amarillamiento de las venas de la papa en variedades y/o clones de *Solanum tuberosum* Linneo, 1753. Lima- Perú.
  17. GERLING, D. 1992. Approaches to the biological control of whiteflies. Florida Entomologist 75 (4), 446-456.
  18. GERMAN-RETANA Sylvie, Candresse Thierry, Martelli Giovanni.1999. Encyclopedia of Virology (Second Edition). CLOSTEROVIRUSES (*CLOSTEROVIRIDAE*). pp: 266 - 273

19. GRANADILLO Cuello J. 2011. Identificación de parasitoides asociados a *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hom: Aleyrodidae) sobre frijol *Phaseolus* sp. En cuatro municipios de la provincia de García Rovira, Santander, Colombia. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Biología. pp: 19 – 30.
20. GUZMAN Mónica, Rodriguez Patricia. 2010. Susceptibility of *Solanum phureja* (Juz. et Buk.) to potato yellow vein virus. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. 38 (2).
21. HOY Marjorie A. 2013. Insect Molecular Genetics (Third Edition). An Introduction to Principles and Applications. Chapter 8 – DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction: Molecular Biology Made Accessible. pp: 307–372
22. JONES David R., 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. Plant Health Group, Central Science Laboratory, Department for Environment, Food and Rural Affairs, Sand Hutton, UK
23. KERRY F. Harris.1983. Sternorrhynchous Vectors of Plant Viruses: Virus-Vector Interactions and Transmission Mechanisms. Advances in Virus Research. 28: 135-137.
24. KISS Zsofia A., Medina Vicente, Falk Bryce W. 2013. Crinivirus replication and host interactions.
25. LOPEZ A. Aristóbulo. 2004. Biología y control biológico de las moscas blancas. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Bogotá – Colombia. Boletín de Sanidad Vegetal 41: 10 – 13.
26. LOPEZ S. N., Viscarret M.M., Botto E.N. 1999. Selección de la planta hospedera y ciclo de desarrollo de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homóptera: Aleyrodidae) sobre zapallito (*Cucurbita máxima* Duch.; Cucurbitales: Cucurbitacea) y tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.; Tubiflorales: Solanacea). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas. 25: 21 – 29.
27. MALAIS, M. y W.J. Ravensberg. 1992. Knowing and recognizing. The biology of glasshouse pests and their natural enemies. Koppert Biological Systems, Holanda. 110 p.

28. MANZANO Maria, Lenteren Jopp. 2009. Life History Parameters of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) at Different Environmental Conditions on Two Bean Cultivars. Dpto. De Ciencias Agrícolas, Univ. Nacional de Colombia. Neotropical Entomology. 38 (4): 452 – 458.
29. MARTIN J.H., and Mound L. 2007. An annotated check list of the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae). Zootaxa 1492: 1-84.
30. MARTIN N.A., Ball R.D., Noldus L.P.J.J. 1991. Distribution of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homóptera, Aleyrodidae) and *Encarsia Formosa* (Hymenoptera, Aphelinidae) in a greenhouse tomato crop: implications for sampling. DSIR Crop Protection, Auckland, New Zeland. New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science.19: 283 – 290.
31. MARTINEZ López Gerardo. Enfermedades causadas por virus en el cultivo de la papa y estrategias para su control.
32. MCKEE Gregory, Zalom Frank, Goodhue Rachael. 2007. Management and Yield Impact of the Greenhouse Whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) on California Strawberries. Department of agribusiness and Applied Economics, North Dakota State. Hortscience. 42 (2): 280 – 284.
33. MORALES Francisco. 2006. Manejo Integrado de Enfermedades de Plantas causadas por Virus transmitidos por Moscas Blancas. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali – Colombia.
34. MORALES Francisco. 2003. The whitefly *Trialeurodes vaporariorum* as a potential constraint to the development of sustainable cropping systems in the mesothermic valleys of the Bolivian Highlands. PROIMPA.
35. MUNIYAPPA V. 1980. Vectors of Plant Pathogens. Chapter 3 – WHITEFLIES. pp: 39 – 85.
36. NINTH REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. 2012. Virus Taxonomy. Family – Closteroviridae. pp: 987 – 1001.
37. NOLDUS, L.P.J.J., X. Rumei y J.C. Van Lenteren. 1986. The parasite host relationship between *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera, Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homóptera, Aleyrodidae).
38. PEREA, E.I., E. Rojas y A. Villalobos. 2003. Diagnóstico de *Trialeurodes*

- vaporariorum* (Homóptera: Aleyrodidae) en tabaco y fríjol de García Rovira (Santander). Revista Colombiana de Entomología. 29(1): 7-10.
39. PUMISACHO Manuel, Sherwood Stephen. 2002. El Cultivo de la Papa en Ecuador. INIAP-CIP, Quito – Ecuador.
  40. RENDON Francisco, Cardona Cesar, Bueno Juan M. 2001. Pérdidas causadas por *Trialeurodes vaporariorum* (Homóptera: Aleyrodidae) y *Thrips palmi* (Thysanoptera: thripidae) en habichuela en el Valle del Cauca. Revista Colombia de Entomología, Colombia. 27 (1-2): 39 – 43.
  41. RODITAKIS Nico E. 1990. Host Plants of Greenhouse Whitefly *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera: Aleyrodidae) in Crete. Attractiveness and Impact on Whitefly Life Stages. Agriculture, Ecosystems and Environment. 31: 217-224
  42. RUBINSTEIN Galina, Czosnek Henryk. 1997. Long-term association of *tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. Journal of General Virology 78: 2683–2689. Israel.
  43. SALAZAR Luis F., Muller G., Querci M., Zapata J. L. and Owens R. A. 2000. *Potato yellow vein virus*: Its host range, distribution in South America and identification as a crinivirus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. Annals of Applied Biology 137: 7-19.
  44. SALAZAR Luis F. 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa, Lima – Perú. 226 p.
  45. SALAZAR Luis F. 1982. Manual de enfermedades virosas de la papa. Centro Internacional de la Papa, Lima - Perú.
  46. SANCHEZ D., Roberto R. Scotta, María C. Arregui. 2002. Monitoreo de estados inmaduros de la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)) (Hemíptera - Aleyrodidae) reinfestando el cultivo de tomate bajo invernadero en el periodo estival. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional del Litoral.
  47. SMITH Peter E. 2009. Whitefly: identification and biology in New Zealand greenhouse tomato crops. Factsheet 1. 8 p.



48. VALLEJO Hugo. 1965. Tesis: Transmisión del Virus del Amarillamiento de las Venas en Papa y su efecto en el rendimiento de Tubérculos. INIAP, Est. Santa Catalina – Ecuador.
49. VENEROS Jaris, Suarez Henry, Tonnang Henri, KroschelJurgen. Lima- Perú. 2012. Comprensión de Sistemas Complejos: Predicción de la distribución geográfica potencial de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) empleando el modelo CLIMEX.
50. WALE Stuart, Platt H.W., Cattlin Nigel. 2008. Diseases, Pests and Disorders of Potatoes.
51. WINTERMANTEL W., Ph.D. 2010. *Bemisia*: Bionomics and Management of a Global Pest. Cap. 10: Transmission Efficiency and Epidemiology of Criniviruses.pp: 319 – 332.
52. WINTERMANTEL W., Ph.D. 2004. Research Plant Pathologist. Emergence of Greenhouse Whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) Transmitted Criniviruses as Threats to Vegetable and Fruit Production in North America. USDA-ARS Crop Improvement and Protection Unit, Salinas.
53. WISLER G. C., Duffus J. E., Liu H., Li R. H. 1998. Ecology and Epidemiology of Whitefly-Transmitted Closteroviruses. USDA-ARS, Salinas, CA. Plant Disease. 82 (3): 270 – 277.
54. ZAPATA José Luis, Alegría Saldarriaga, Luis F. Salazar. Colombia, 2004. El amarillamiento de las venas en papa. Boletín técnico CORPOICA.
55. ZAPATA José Luis. 2000. Manejo integrado de las enfermedades de la papa. Manual Técnico, CORPOICA, pp. 130-140.

**Páginas Web consultadas:**

- Catálogo del Centro Internacional de la Papa. Disponible en: <https://research.cip.cgiar.org/redlatinpapa/pages/home.php>
- FAO. Año Internacional de la papa 2008. Disponible en <http://www.fao.org/potato-2008/es/index.html>

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Protocolo de extracción de ARN totales con Trizol

1. Moler de 100 a 200 mg de tejido vegetal fresco con 1.5 mL de Trizol (TRIzol® Reagent) en una bolsa de muestreo (plástico). Macerar usando un tubo de vidrio, luego transferir el resultado a un tubo microcentrífuga Eppendorf de 2 mL. Vórtex por 5 min a temperatura ambiente.
2. Centrifugar a 12 000 rpm por 5 min.
3. Transferir la fase líquida a un nuevo tubo de microcentrífuga Eppendorf de 2 mL y agregar 0.4 mL de cloroformo. Agitar vigorosamente por 15 segundos (no utilizar vórtex), y dejar a temperatura ambiente por 2 minutos.
4. Centrifugar a 12 000 rpm por 15 minutos a 4 °C y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga Eppendorf de 1.5 mL. Agregar 1 mL de Isopropanol, homogeneizar suavemente. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 12 000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
6. Desechar el sobrenadante y lavar el pellet formado (sedimento) con 1 mL de Etanol al 70-80 %, y centrifugar a 12 000 rpm por 10 minutos.
7. Decantar el sobrenadante y re suspender el pellet resultante en 250 µL de NFW (Nuclease - Free Water). Añadir 250 µL de cloruro de litio (LiCl) 4M. Incubar por 24 horas a 4°C.

8. Sedimentar el RNA por centrifugación a 12 000 rpm por 20 minutos a 4 °C.
9. Desechar el sobrenadante y lavar el sedimento con 1 mL de Etanol al 70-80 %.
10. Centrifugar a 12 000 por 10 minutos a 4 °C.
11. Desechar el sobrenadante y dejar secar el sedimento a temperatura ambiente por 30 minutos.
12. Re suspender el pellet resultante en 20 µL de NFW (Nuclease - Free Water) y guardar a -20 °C.

#### **ANEXO 2:** Determinación de la concentración de Ácidos nucleicos totales

1. El RNA total fue extraído a partir de las muestras de tejido vegetal utilizando un protocolo de extracción del reactivo Trizol (instrucciones del fabricante). (Anexo 1)
2. Adicionalmente, se determinó la concentración de ácidos nucleicos totales y la pureza a partir de la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo scientific) a 260 nm, y el programa ND-1000 V3.5.2.

#### **ANEXO 3:** Detección de PYVV por RT-PCR

1. Se confirmó la presencia del virus en las plantas mediante la prueba molecular RT-PCR llevada a cabo en 2 pasos.
  - a. Primero, el cDNA fue sintetizado por transcripción reversa (RT), para lo cual se prepararon 2 MIX (RT Master Mix y RT Mix). El RT Master Mix contenía 8 microlitros (ul) de agua libre de nucleasa (NFW), 2 ul de Random primers

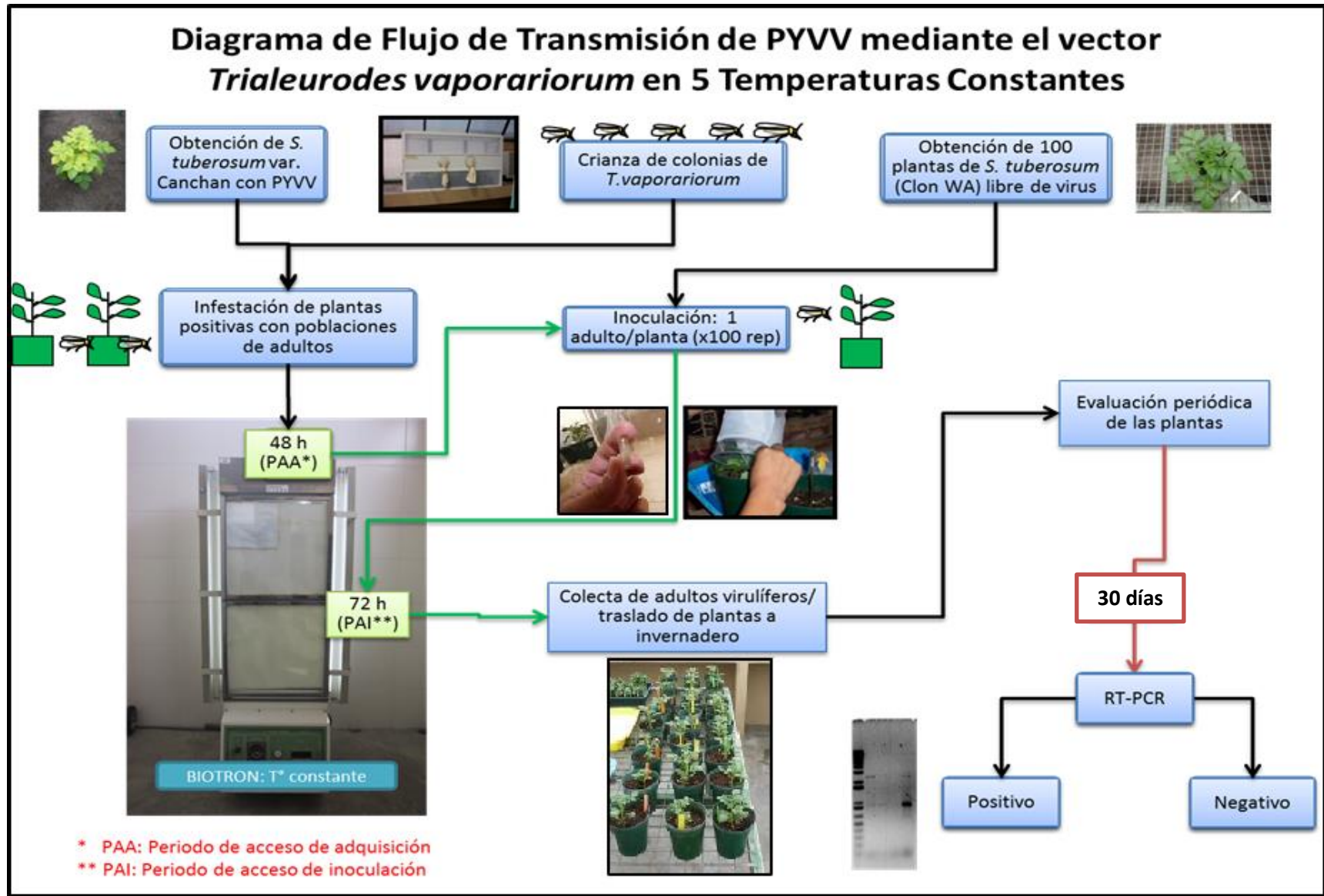
(250ng/ul), 1 ul de dNTPs (10 mM) y 2 ul de ácidos nucleicos totales (500 ng/ul). La mezcla se colocó en el Termociclador (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 65 °C durante 10 minutos y luego a 10 °C durante 5 minutos. Luego agregar el RT Mix, el cual contenía: 4 ul de Buffer First Strand 5X, 2 ul DTT (100 mM), 0.5 ul RNAsa OUT (inhibidor de ribonucleasas) y 0.5 ul de M-MLV (transcriptasa). Mezclar ambos Mix y homogeneizar suavemente. Colocar en el Termociclador con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 37 °C por 50 minutos, 70 °C por 15 minutos y finalmente 10 °C. El volumen final obtenido fue un cDNA de 20 ul, el cual debe ser diluido con 80 ul de NFW para obtener una dilución de 1/5.

- b. Luego el cDNA de cada muestra fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual se realizaron con 20 ul de reacción, conteniendo: 4 ul de PCR Buffer 5X (Promega), 1 ul de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 ul de dNTPs (10 mM), 0.5 ul de Primer CP1-sentido viral: 5'-GGA TCC ATG GAA ATC CGA TCG T-3' y 0.5 de Primer CP2 –complementario: 5'-GAA TTC TCA ATA GAT CCT GCT A-3', ambos a 10 uM, diseñados para amplificar una región de 760 pares de bases (pb) correspondientes a los genes de la Proteína de la cápside de PYVV, 0.5 ul de la proteína *Taq* ADN polimerasa (Promega), 8 ul de agua libre de nucleasa (NFW) y 5 ul de de cDNA (1/5). La mezcla se colocó en el Termociclador con las siguientes condiciones: Un ciclo a 95 °C por 5 minutos (Denaturación), 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto (denaturación), 60 °C por 1 minuto 30 segundos (apareamiento) y 72 °C por 1 minuto (extensión). Un ciclo a 72 °C por 10 minutos (extensión). Las reacciones obtenidas se guardaron a 4 °C.

#### **ANEXO 4:** Electroforesis

- 1.** El resultado de los productos obtenidos del PCR (10 ul) fue analizado mediante Electroforesis en Gel de Agarosa 1% en buffer TAE 1X (Tris buffer, ácido acético, EDTA, pH 8.3 con ácido acético glacial) y teñido con 1 % de Gel Red (Invitrogen). Además se colocó el marcador Ladder 1kb. Luego, el gel fue visualizado mediante el Gel Doc™ XR (Bio-Rad) y el software Quantity One®, en donde se adquirieron imágenes en tiempo real.

ANEXO 5: Diagrama de flujo para el procedimiento de la transmisión del virus PYVV por su vector *Trialeurodes vaporariorum*



**ANEXO 6:** Confirmación por RT-PCR en cada temperatura-tratamiento empleando 1 individuo como vector

Temperatura / Numero de Rep.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
12°C				1																					
15°C	1	1							1	1					1			1			1				1
18°C					1																1				
20°C																									
25°C										1															

Temperatura / Numero de Rep.	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
12°C	1		1													1									1
15°C								1	1		1	1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18°C											1														
20°C																									
25°C																									

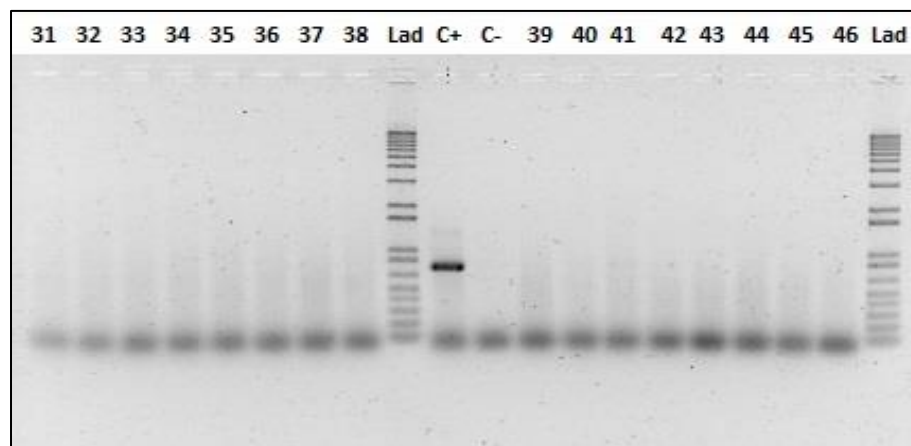
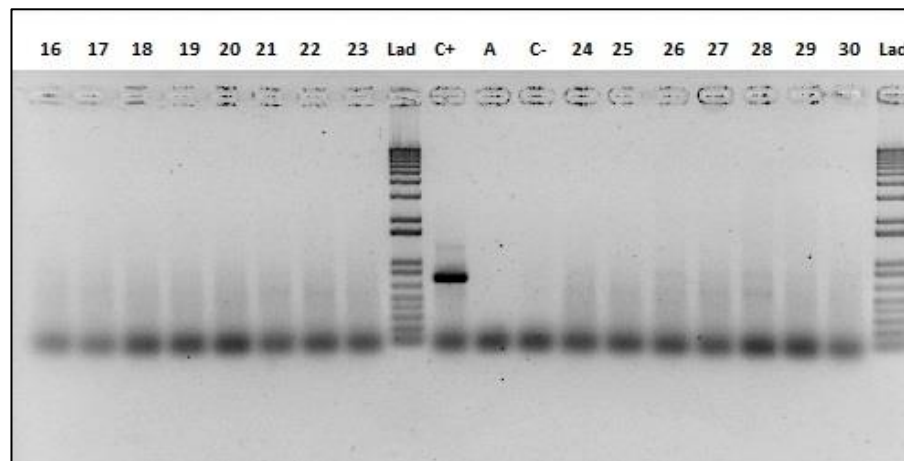
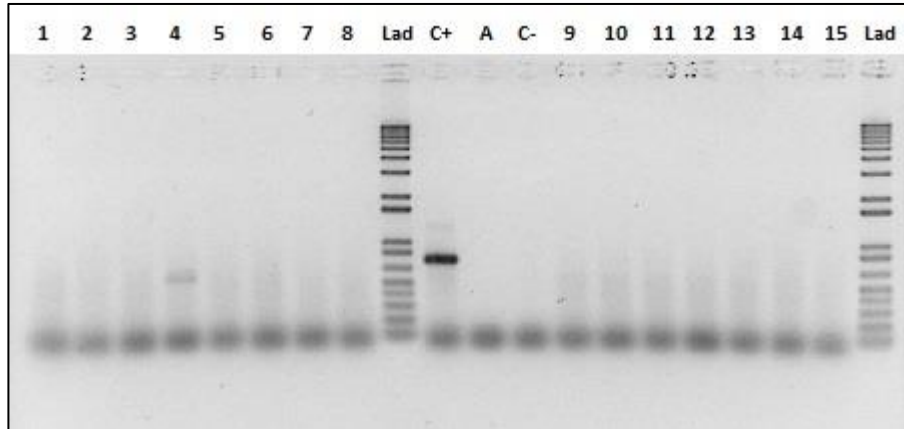
Temperatura / Numero de Rep.	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
12°C								1				1			1							1	1		1
15°C	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
18°C																									
20°C																								1	
25°C				1																					

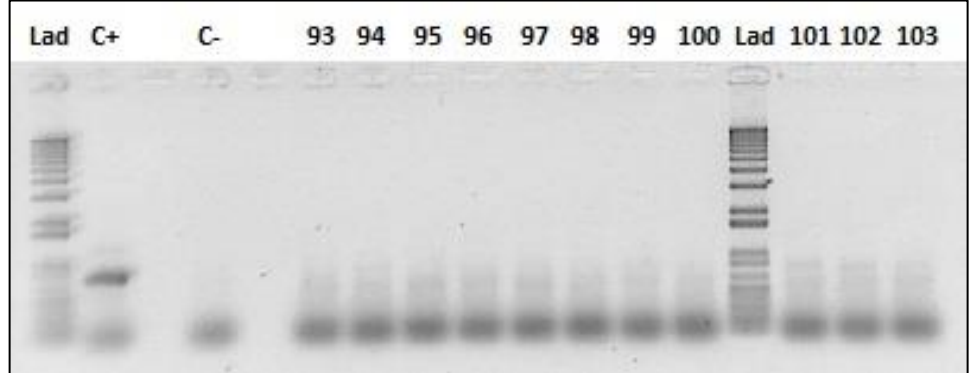
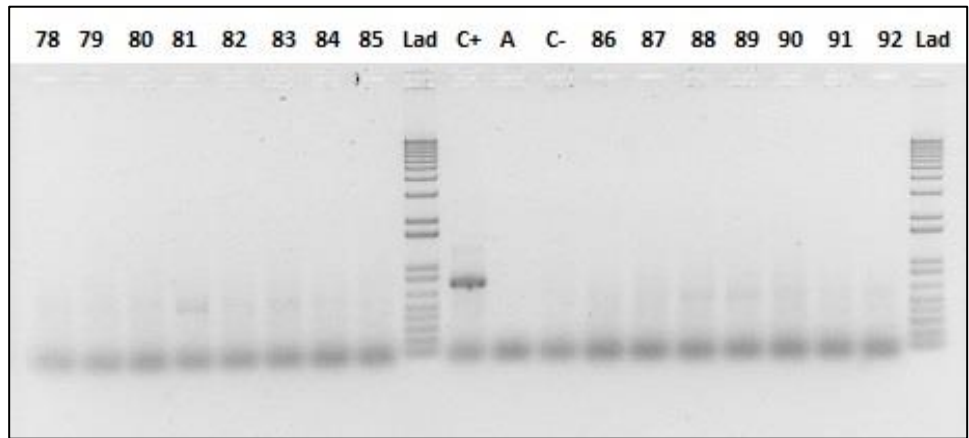
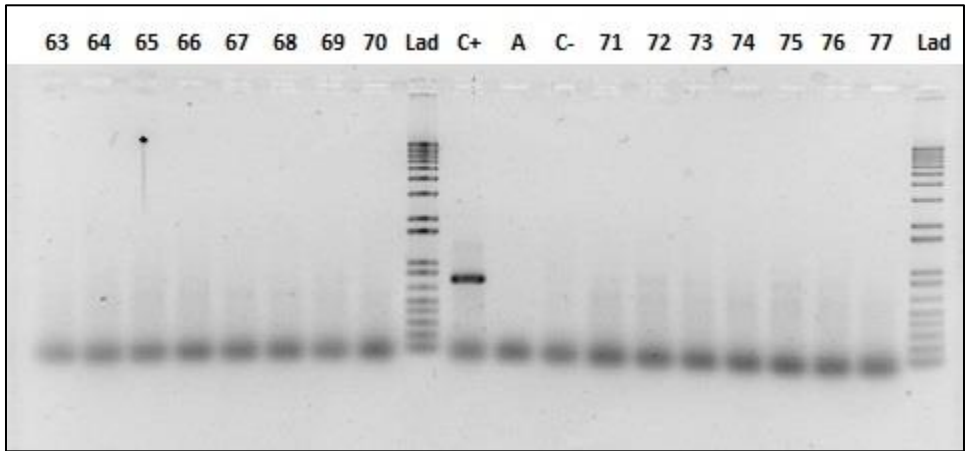
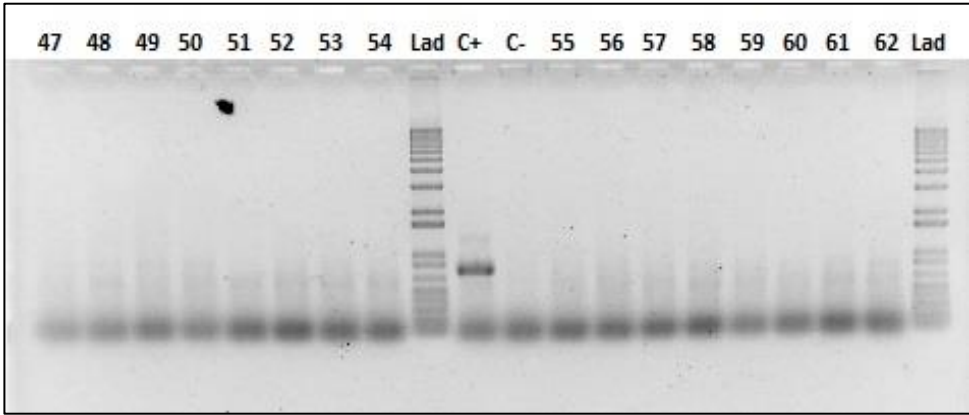
Temperatura / Numero de Rep.	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	Total de plantas infectadas
12°C										1					1				1							14
15°C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					1	1	1	1			1	64
18°C																	1									4
20°C					1									1										1		4
25°C																								1		3

\*1 es equivalente a positivo (presencia del virus)



**ANEXO 7:** Detección de PYVV por RT-PCR en la temperatura-tratamiento a 12 °C





**ANEXO 8:** Confirmación por RT-PCR en cada tratamiento a temperatura constante empleando un grupo de 50 adultos virulíferos como vectores.

Temperatura / Numero de Rep.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total de plantas infectadas
12°C	1	1	1		1	1	1	1		1	8
15°C			1	1	1	1	1		1		6
18°C							1	1			2
20°C											0
25°C					1						1

\*1 es equivalente a positivo (presencia del virus)

**ANEXO 9:** Confirmación por RT-PCR de la transmisión seriada en la 3ra temperatura fluctuante empleando un adulto virulífero.

<b>3ra Temperatura Fluctuante con 1 adulto</b>
--

Adulto / día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	1	1	1	1	1				
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1				
4	1	1	1	1	1					
5	1	1	1	1	1	1	1		1	
6	1	1	1	1	1					

\*1 es equivalente a positivo (presencia del virus)

**ANEXO 10:** Confirmación por RT-PCR de la transmisión seriada en temperatura fluctuante empleando un grupo de 50 adultos virulíferos.

<b>Temperatura Fluctuante con 50 adultos</b>
--

<b>Adultos / día</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>1</b>	1	1	1	1	1		1			
<b>2</b>	1	1	1	1			1	1	1	1
<b>3</b>	1	1	1				1	1	1	
<b>4</b>	1				1	1		1	1	1
<b>5</b>	1	1	1	1	1	1	1		1	1
<b>6</b>	1	1	1	1	1		1	1		

**\*1 es equivalente a positivo (presencia del virus)**