CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN NUEVO BEGOMOVIRUS DEL TOMATE EN EL VALLE DEL CAUCA Y BÚSQUEDA DE FUENTES DE RESISTENCIA PARA EL MEJORAMIENTO DE LA VARIEDAD UNAPAL MARAVILLA

ANA KARINE MARTINEZ ASCANIO
Código 7205006

Trabajo de grado presentado para optar al título de Magíster en Ciencias Agrarias énfasis en Fitomejoramiento.

DIRIGIDO POR:

Dr. Franco Alirio Vallejo
Dr. Francisco Morales

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADOS
Palmira, 2008

Caracterización molecular de un nuevo begomovirus del tomate en el Valle del Cauca y búsqueda de fuentes de resistencia para el mejoramiento de la variedad Unapal Maravilla.

Molecular characterization of a new begomovirus affecting tomato in the Cauca Valley and identification of sources of resistance to improve variety Unapal Maravilla.

Resumen

En los últimos años, el Valle del Cauca ha sufrido la incidencia de begomovirus en plantaciones de tomate causando el abandono de muchas áreas de cultivo. El control de estos virus ha estado enfocado hacia el control del vector pero las medidas implementadas no son totalmente efectivas. Por esta razón, el desarrollo y uso de variedades de tomate resistentes a los begomovirus se plantea como la mejor alternativa de control de estos patógenos. En este trabajo se caracterizó molecularmente al virus transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci* al tomate en el Valle del cauca, como una variante del *Virus del mosaico amarillo del tomate* (*Tomato yellow mosaic virus* = ToYMV). Se evaluaron, como posibles fuentes de resistencia a este virus, las líneas de tomate FLA 496-11-6-1-0, FLA 478-6-3-1-11, FLA 456-4 y FLA 653-3-1-0. Plantas de 20 días de edad fueron confinadas en jaulas individuales con 10 individuos virulíferos de *B. tabaci* (biotipo B) por planta, en condiciones de invernadero. La infección por el virus se confirmó por el desarrollo de los síntomas y las pruebas moleculares de PCR e hibridación *dot blot*. Las características agro-morfológicas se evaluaron en campo en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Las líneas FLA 653-3-1-0, FLA 496-11-6-1-0 y FLA 478-6-3-1-11 desarrollaron síntomas muy leves, el ADN viral fue apenas detectable para algunos individuos y presentaron características del fruto y rendimientos deseables, indicando que son buenas fuentes de resistencia

Summary

Last years, the Cauca Valley has suffered the incidence of begomovirus in tomato plantations causing the abandonment of many cultivable areas. The control of these viruses is mainly oriented to control vector population; however any of these practices are completely effective. For this reason, the development and use of resistant tomato cultivars is the best alternative for controlling these pathogens. In this work a virus transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* to tomato was characterized in the Cauca Valley like a variant of *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV). Lines FLA 496-11-6-1-0, FLA 478-6-3-1-11, FLA 456-4 y FLA 653-3-1-0 were evaluated as possible sources of resistance to this virus. Artificial whitefly-mediated inoculation in the greenhouse was done with tomato plants 20 days-old exposed to 10 viruliferous individuals of *B. tabaci* (biotype B) per plant in individual insect-proof cages. The presence of the Begomovirus was evaluated by symptoms development and was confirmed using dot blot hybridization and PCR. Agronomical characteristics were evaluated in the field in a completely randomized blocks design with 3 replications. Lines FLA 653-3-1-0, FLA 496-11-6-1-0 y FLA 478-6-3-1-11 developed mild symptoms, viral DNA was barely detectable in some individuals, and they showed characteristics of the fruit and yield desirable.

Palabras claves: *Solanum lycopersicum*, *Begomovirus*, *Bemisia tabaci*, resistencia
Key words: *Solanum lycopersicum*, *Begomovirus*, *Bemisia tabaci*, resistance.

Autor: Ana Karine Martínez Ascanio (1979)

Nota de Advertencia

La Facultad y los jurados de la tesis de grado no son responsables de las líneas emitidas por el o los autores.

“Artículo 24 de la resolución No. 04 de 1974”

A mi amado esposo Juan Fernando,
mis padres y hermanos
quienes son mi soporte y mi fuerza.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Peter Hanson del Centro Asiático para el Desarrollo e Investigación de Vegetales (AVRDC) por el envío de las semillas de las líneas evaluadas en este trabajo.

Al Dr. Francisco Morales que me dio la oportunidad de ser parte de su equipo, me apoyó para realizar la maestría y me brindó sus aportes para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Franco Alirio Vallejo por su apoyo constante en el transcurso de la maestría y del trabajo de tesis.

A Alejandro Quintero por su inmensa colaboración en los trabajos realizados en invernadero y campo.

A los trabajadores del campo de la Universidad Nacional sede Palmira por su colaboración en el montaje y control de los ensayos de campo.

A los compañeros de la Unidad de Virología del CIAT.

A mi esposo por ser mi apoyo, por brindarme su amor sin límites y tener la paciencia para escuchar mis quejas cuando las cosas no marchaban bien; por sus acertados aportes en la escritura de este documento.

A mis padres Jesús y Mireya por su inmenso amor y dedicación que han hecho que este sea un logro más en mi vida.

A mis hermanos Melisa y Jesús Alejandro por su cariño y apoyo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN **1**

1. OBJETIVOS **5**

1.1 Objetivo General 5

1.2 Objetivos Específicos 5

2. MARCO CONCEPTUAL **6**

2.1. Tomate (Solanum lycopersicum) (syn. Lycopersicon esculentum) 6

2.1.1. Tomate var. Unapal Maravilla 7

2.2. Geminivirus 8

2.2.1. Begomovirus 9

2.2.1.1. Begomovirus en Colombia 10

2.2.1.2. Begomovirus en tomate 11

2.3. Mosca Blanca (*Bemisia tabaci* Genn) 13

2.4. Estrategias para controlar begomovirus que afectan el tomate 14

2.4.1. Mejoramiento tradicional 16

3. MATERIALES Y METODOS **18**

3.1. Localización 18

3.2. Germoplasma Vegetal 18

3.3. Fuente del Virus 18

3.3. Caracterización Molecular del Virus 19

3.4. Evaluación de la resistencia de las líneas al begomovirus. 22

3.4.1. Inoculación en jaula individual. 22

3.4.2. Detección molecular del virus.....24

3.4.2.1. PCR 24

3.4.2.2. *dot-blot* 25

3.5. Evaluación agro-morfológica de las líneas 26

4. RESULTADOS.....27

4.1. Caracterización molecular del virus.....27

4.2. Estandarización del método de inoculación. 28

4.3. Evaluación de la resistencia al begomovirus. 30

4.4. Evaluación agro-morfológica.....38

5. DISCUSIÓN 43

6. CONCLUSIONES 52

7. BIBLIOGRAFÍA 53

8. ANEXOS 57

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Mapa genómico de los begomovirus mostrando las parejas de cebadores utilizadas para el ADN-A (PAR1c496/PaL1v1978, PAR1c715/PAL1v1978, PAR1v722/PAL1c1960) y el ADN-B (PCRc2/PBL1v2040) 18

Figura 2. Montaje de inoculación en Jaula Individual. En la foto se muestra el tubo de acetato donde se colectaron las moscas junto a la plántula encerrados en la jaula de acetato tapada con tul..... 19

Figura 3. *Contig* de secuencias elaborado con el programa *Sequencher* 4.6, mostrando la secuencia total (2596 nt.) del componente del ADN-A del virus caracterizado..... 23

Figura 4. Hibridación *dot blot* de hojas jóvenes de tomate var. Unapal-maravilla, después de 45 días de la inoculación con moscas blancas infectadas con begomovirus. Los números en los recuadros indican los números asignados en el laboratorio (Tabla 2); (+) Control enfermo..... 25

Figura 6. Primera Evaluación. Hibridación *dot blot* de hojas jóvenes de materiales de *Solanum* spp. inoculados con ToYMV. A- 14 días después de la inoculación (DDI), B- 21 DDI, C- 28 DDI..... 28

Figura 7. Segunda Evaluación. Hibridación *dot blot* de hojas jóvenes de materiales de *Solanum* spp. inoculados con ToYMV. A- 14 días después de la inoculación (DDI), B- 21 DDI, C- 28 DDI..... 31

Figura 8. Frutos de los materiales de *Solanum* spp. evaluados para la resistencia a begomovirus..... 33

Figura 9. Síntomas virales observados en campo en la línea CLN2026D (A) y la variedad Unapal-Maravilla (B)..... 34

Figura 10. Hibridación *dot blot* de hojas jóvenes de materiales de *Solanum* spp. evaluadas en campo e inoculadas naturalmente..... 35

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Escala de evaluación de severidad de síntomas..... 20

Tabla 2. Resultados de la estandarización del método de inoculación en jaula individual..... 24

Tabla 3. Primera evaluación de la respuesta de los genotipos a la inoculación en jaula individual del begomovirus ToYMV..... 26

Tabla 4. Segunda evaluación de la respuesta de los genotipos a la inoculación en jaula individual del begomovirus ToYMV..... 27

Tabla 5. Detección de plantas con ADN viral con las técnicas de PCR y *dot blot* para la segunda evaluación de la respuesta de los genotipos a la inoculación en jaula individual del begomovirus ToYMV..... 30

Tabla 6. Evaluación en campo del rendimiento y formato del fruto de los genotipos evaluados para la resistencia al ToYMV..... 32

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Resultados de los Análisis de Varianza para los resultados de severidad para tres fechas de evaluación..... 47

Anexo B. Resultados de la Prueba de Duncan para la variable severidad..... 47

Anexo C. Resultados de los Análisis de Varianza para las características del fruto..... 48

INTRODUCCIÓN

El tomate es uno de los vegetales de mayor importancia económica en el mundo por ser parte de la canasta básica familiar de la mayoría de países. Esto se evidencia en un incremento del 3.5 % en la producción mundial entre los años 2000 y 2005, para un total de 4.599.000 *has* cosechadas. En Colombia, a pesar de que la producción de tomate se ha expandido a casi todos los departamentos del país, las áreas sembradas en tomate parecen haber disminuido en los últimos años y las tendencias de producción son totalmente diferentes. Así, mientras en el año 2000 se cosecharon 17.264 *has*, en el 2006 se sembraron solo 8.688 *has* para una reducción de la producción de 375,082 *ton* a 241,987 *ton*. (Corporación Colombia Internacional, 2006). Una de las causas principales de la disminución en la producción del cultivo es la aparición de nuevas enfermedades virales en el país (Morales *et al*., 2002), en especial aquellas causadas por virus del género *Begomovirus*.

La mayoría de los begomovirus pertenecientes a la familia *Geminiviridae*, tienen genomas bipartitos con un componente de ADN-A y otro de ADN-B empaquetados en partículas geminadas (Fauquet *et al*, 2003). Estos virus causan pérdidas significativas en cosecha y frecuentemente hasta la totalidad de la producción de cultivos importantes para alimentación e industria en agroecosistemas tropicales y subtropicales alrededor del mundo

(Morales & Anderson, 2001). La importancia de los begomovirus está estrechamente asociada a su transmisión por la mosca blanca *Bemisia tabaci* Genn., la cual ha sido considerada una de las peores plagas del último siglo (Anderson & Morales, 2005).

En Colombia se han registrado brotes de begomovirus en cultivos de importancia económica en varios departamentos (Morales *et al*. 2000, 2002). En los últimos años, el Valle del Cauca ha sufrido la incidencia de estos virus en plantaciones de tomate y habichuela, lo cual ha causado el abandono de muchas áreas de cultivo. Este hecho pone de manifiesto el gran potencial epidemiológico que han mostrado los begomovirus en otras regiones del mundo. Estas epidemias también están asociadas a la aparición de un nuevo biotipo (B) de *B. tabaci*, más agresivo que el biotipo original (A) que se encontraba en bajas poblaciones en el Valle del Cauca, anteriormente. La invasión del valle geográfico del Río Cauca por el nuevo biotipo B de *B. tabaci*, ha sido también favorecida por períodos de sequía prolongada en años anteriores, que favorecieron la reproducción de esta mosca blanca y el desplazamiento de otras especies, como *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), que predominaban en el Valle del Cauca (Morales *et al*, 2002).

El control de virus transmitidos por mosca blanca está principalmente orientado a disminuir las poblaciones del vector mediante el uso de insecticidas. Desafortunadamente, la mosca blanca ha desarrollado resistencia a los insecticidas tradicionales utilizados, y los nuevos productos son costosos y no logran controlar las altas poblaciones de *B. tabaci* que se generan actualmente. Igualmente, el control biológico no logra disminuir las altas

poblaciones de moscas blancas vectoras antes de que estas transmitan los begomovirus a los cultivos susceptibles. Las prácticas culturales para el control de mosca blanca pueden ser efectivas en países de clima templado, donde el invierno controla la plaga rompiendo su ciclo biológico. Pero en las condiciones del trópico, las poblaciones de mosca blanca se mantienen altas debido a la sucesión constante de cultivos hospederos. Es por estas razones, que el desarrollo y uso de variedades de tomate resistentes a los begomovirus, es la mejor alternativa de control de estos patógenos. Desafortunadamente, a pesar de que el tomate es una especie originaria del neotrópico, el mejoramiento genético del tomate se ha llevado a cabo en países industrializados de la zona templada (Morales, 2001). Por consiguiente, las variedades comerciales de tomate mejoradas en esos países, no son adaptadas a las condiciones y plagas del trópico, incluyendo los begomovirus.

En Colombia, como en el resto de la América Latina, la mayoría de las variedades comerciales son susceptibles a los begomovirus, pero ya se ha iniciado un proceso de selección de variedades e híbridos que presentan cierto nivel de resistencia. Trabajos de evaluación de posibles fuentes de resistencia a begomovirus del tomate en la América Latina, realizados por el Proyecto Tropical Mosca Blanca-MIP, han identificado unas pocas fuentes de resistencia a begomovirus del tomate presentes en la América Central y México. Estas fuentes de resistencia son líneas desarrolladas en el Estado de Florida, Estados Unidos, contra un begomovirus de origen neo-tropical (*Tomato mottle virus*), las cuales han sido incluidas dentro de un grupo de fuentes de resistencia a diversos

begomovirus del tomate a nivel mundial por el Centro Asiático para el Mejoramiento y Desarrollo de la Horticultura (AVRDC) en Taiwán.

En este trabajo se busca evaluar estas líneas como posibles fuentes de resistencia para el mejoramiento de las variedades regionales como la Unapal Maravilla con características agronómicas deseables pero altamente susceptible a begomovirus. Con este programa se pretende reducir las pérdidas económicas provocadas por las enfermedades virales en los últimos años, tratando de no afectar la producción y calidad del cultivo.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Caracterizar el begomovirus detectado en el Valle del Cauca y evaluar 4 líneas de tomate (FLA 496-11-6-1-0, FLA 478-6-3-1-11, FLA 456-4 y FLA 653-3-1-0) como posibles fuentes de resistencia al begomovirus que afecta la variedad de tomate Unapal Maravilla en el Valle del Cauca.

1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar molecularmente el ADN-A del begomovirus detectado en el cultivo de tomate en el Valle del Cauca.
- Evaluar el comportamiento agronómico y productivo de las líneas FLA 496-11-6-1-0, FLA 478-6-3-1-11, FLA 456-4 y FLA 653-3-1-0.
- Determinar la resistencia a begomovirus de las líneas FLA 496-11-6-1-0, FLA 478-6-3-1-11, FLA 456-4 y FLA 653-3-1-0.
- Seleccionar las líneas con mejor comportamiento agronómico y de resistencia para el inicio del programa de mejoramiento genético del tomate var. Unapal Maravilla.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1. Tomate (Solanum lycopersicum) (syn. Lycopersicon esculentum)

El tomate es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia Solanaceae y al género *Solanum*. La especie *S. lycopersicum* es la especie cultivada y posee nueve especies silvestres relacionadas; es nativo de la América del Sur, pero aparentemente domesticado en Mesoamérica en tiempos pre-Hispánicos. Actualmente se cultiva en toda la América latina, incluyendo la región Caribe (Vallejo, 1999). Se cree que su centro de origen es el norte de Suramérica, sin embargo, este cultivo ha sido genéticamente manipulado de forma extensa fuera de las Américas (Morales & Anderson, 2001).

El tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico debido a la importancia que tiene este producto en la dieta básica de la mayoría de poblaciones. De acuerdo con la FAO, en 2005 se importó un total de 116 millones de toneladas de vegetales u hortalizas en el mundo, de las cuales, las importaciones de tomate representaron casi el 25% del total. El incremento anual de la producción, en los últimos años, se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. A nivel mundial, los principales productores son China, con más de 30 millones de toneladas en el 2005, y Estados Unidos que además es el

principal importador. En Suramérica, se destacan Brasil y Chile como los mayores productores (Corporación Colombia Internacional, 2006).

En Colombia, la producción de tomate es una actividad agrícola riesgosa por el escaso apoyo económico y técnico y los grandes problemas sanitarios. La ventaja de este cultivo es que es de período vegetativo corto, de alta demanda, y puede llegar a ser muy rentable (Vallejo, 1999). Los principales productores son los departamentos de Antioquia, Norte de Santander y Cundinamarca, que abarcan un 36% de la producción nacional. (Corporación Colombia Internacional, 2006).

2.1.1. Tomate var. Unapal Maravilla

Esta variedad de tomate desarrollada por el Programa de investigación de Hortalizas de la Universidad Nacional, sede Palmira, posee mayor rendimiento y producción por planta, fruto firme, precoz, consistente y pesado, al punto que resiste en óptimas condiciones la manipulación implicada en los procesos de almacenamiento, empaque y transporte, características que satisfacen las necesidades requeridas por los intermediarios, agricultores y comerciantes de la hortaliza.

La primera inflorescencia de la planta aparece entre los 25-30 días a una altura de 25 cm, rasgos que la diferencian fácilmente de otras variedades comerciales de su tipo. Cada planta produce en promedio 12 racimos (ocho de ellos en el eje principal) y éstos forman

entre cinco y seis frutos, cuyo peso individual es de 150 gramos. Con esta variedad se puede obtener una producción en campo de 70 a 80 ton/ha, cifra que supera los promedios nacionales de que varían entre 27 a 30 a ton-ha. A pesar de su tolerancia a ciertas plagas, enfermedades y condiciones adversas de clima y suelo, la nueva variedad ha resultado ser altamente susceptible al ataque de begomovirus.

2.2. Geminivirus

Los geminivirus forman la segunda familia (*Geminiviridae*) más grande de los virus vegetales, que infectan un amplio rango de especies cultivadas importantes, causando pérdidas significativas. Estos virus se caracterizan por tener ADN de cadena sencilla empaquetado dentro de partículas gemelas. La familia *Geminiviridae* comprende en la actualidad cuatro géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*, que se diferencian básicamente por el tipo de vector, organización del genoma y tipo de hospedero (Fauquet *et al*, 2003).

Durante las dos últimas décadas estos virus han emergido como patógenos devastadores, particularmente en los trópicos y subtrópicos, causando grandes pérdidas económicas y amenazas a la producción del cultivo. La emergencia de problemas de geminivirus alrededor del mundo ha dependido de la contribución individual o en conjunto de varios factores, incluyendo la aparición de geminivirus mutantes y recombinantes, cambios relacionados con los insectos vectores, el movimiento de material vegetal infectado, la

introducción de cultivos o genotipos susceptibles a virus endémicos en una región, los cambios en los sistemas de cultivos y los factores climáticos. (Varma & Malathi, 2003)

2.2.1. Begomovirus

El género *Begomovirus*, con *Bean golden yellow mosaic virus* como la especie tipo, contiene virus que son transmitidos a plantas dicotiledóneas por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Fauquet *et al*, 2003). Estos virus son transmitidos de una manera circulativa y persistente por la mosca blanca (Polston & Anderson, 1997). Algunas especies son transmisibles por inoculación mecánica y otras se han transmitido experimentalmente por transferencia de componentes del genoma clonados mediada por *Agrobacterium* o biolísticamente (Van Regenmortel *et al*., 2000). La mayoría de begomovirus tienen genomas bipartitos (componentes ADN - A y ADN – B), mientras que algunos begomovirus con genoma monopartito son originarios del Viejo Mundo, principalmente el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y el *Tomato Leaf Curl Virus* (TLCV) (Fauquet *et al*, 2003).

Comparados a los mastrevirus y curtovirus, los begomovirus han emergido como problemas más serios en una variedad de cultivos como yuca, algodón, legumbres y hortalizas alrededor del mundo, causando enfermedades que pueden llegar a ser devastadoras (Varma & Malathi, 2003). Latinoamérica ha sido la región mas afectada en términos del número total de geminivirus transmitidos por mosca blanca, el número de

cultivos afectados, pérdidas de rendimiento, y área devastada por estos patógenos. Para el 2001 se reportaba que alrededor de 5 millones de hectáreas de tierras cultivables principales en veinte países estaban bajo el ataque de más de 30 begomovirus distintos (Morales & Anderson, 2001).

Los principales factores que contribuyen a la emergencia de las nuevas enfermedades de begomovirus son la evolución de variantes de los virus, la aparición del biotipo B de la mosca blanca, y el incremento en la población del vector (Varma & Malathi, 2003). La evolución constante de estos virus sumada al descubrimiento de moléculas de ADN satélite formando complejos con los begomovirus (Mansoor *et al*., 2003) plantea una seria amenaza a la agricultura sostenible del trópico y subtrópico.

2.2.1.1. Begomovirus en Colombia

Solo hasta la década de los 70s, con el trabajo de Gálvez y colaboradores en el cultivo de fríjol común, se reportan enfermedades causadas por estos virus (Morales *et al*., 2000, Morales *et al*., 2002). El país aparentemente permanecía libre de begomovirus, pero nuevos reportes se hicieron en el 2000 por Morales y colaboradores en diversos cultivos de importancia socioeconómica para el país como frutales, soya, melón y tabaco. La mayoría de estos virus detectados no habían sido descritos en otros países. En el 2002, se reportaron nuevos brotes de enfermedades en habichuela y tomate, siendo este último uno de los cultivos más intensificado y con un uso exagerado de agroquímicos. Estos nuevos brotes han sido asociados a la diversificación de cultivos, al uso intensivo de pesticidas, que causa

la eliminación de enemigos naturales y el desarrollo de *B. tabaci* resistente a pesticidas, y a cambios climáticos (Morales *et al*., 2002). En el Valle del Cauca, un periodo prolongado de sequía en el segundo semestre (Julio-Diciembre) de 2002 favoreció la aparición del biotipo B de *B. tabaci*, causando considerables daños fisiológicos (maduración irregular) al tomate y transmitiendo geminivirus en tomate y habichuela (Morales & Jones, 2004).

2.2.1.2. Begomovirus en tomate

El tomate parece ser una especie particularmente susceptible a los begomovirus (Polston & Anderson, 1997). Unas 34 especies de begomovirus reconocidas y 18 tentativas han sido encontradas infectando naturalmente al tomate. La mayoría de estos virus inducen en el tomate síntomas característicos de las enfermedades de hoja rizada, incluyendo una severa reducción en el tamaño de la hoja, rizado hacia abajo, arrugamiento intervenal, clorosis intervenal y marginal, decoloración púrpura de las superficies abaxiales de las hojas, acortamiento de entrenudos, desarrollo de pequeñas ramas y reducida formación de fruto. (Varma & Malathi, 2003).

La mayoría de los nuevos begomovirus que afectan al tomate han sido identificados en las Américas donde, en solo 30 años, se han encontrado al menos 30 nuevos begomovirus en tomate en las Américas (Morales & Anderson, 2001). De estos, la mayoría son bipartitos, aunque en 1994 se hace el primer reporte del begomovirus monopartito *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en la República Dominicana (Polston *et al*., 1994). En la actualidad, son ya varios los reportes que se han hecho en el continente americano (Momol *et al*.,

1999; Ling *et al*., 2006; Ascencio-Ibañez *et al*., 1999) siendo el último de ellos en Venezuela (Zambrano *et al*., 2007).

En Suramérica, el primer reconocimiento de un geminivirus como la causa de una enfermedad en tomate transmitida por mosca blanca ocurrió con el mosaico dorado del tomate (*Tomato golden mosaic virus*), en los inicios de la década de los 60, en Brasil (Flores *et al.*, 1960 en Morales, 2006). En Venezuela por la misma época, se reconocía una enfermedad caracterizada por un mosaico amarillo brillante que limitaba la producción de tomate y que posteriormente fue asociada a la presencia del *Virus del mosaico amarillo del tomate* (*Tomato yellow mosaic virus* = ToYMV) (Lastra & Uzcátegui, 1975 en Morales *et al.*, 2001). Posteriormente, este virus fue reportado de infectar papa (*Solanum tuberosum*) en condiciones de campo en el estado de Aragua, Venezuela (Debrot & Centeno, 1985), y en 1986 es reportado como un nuevo geminivirus, el '*Virus del mosaico amarillo de la papa'* (*Potato yellow mosaic virus* –PYMV). Como consecuencia los begomovirus que se encuentran afectando tomate en la región Caribe y tenían relación con el ToYMV, son denominados en la actualidad como PYMV (Morales, 2006). Sin embargo, Morales y colaboradores (2001) basados en estudios de secuencias, donde las identidades nucleotídicas y de aminoácidos son superiores al 95% entre aislados venezolanos y el denominado PYMV, demostraron que el nombre correcto para este virus es ToYMV.

En Colombia, los reportes de begomovirus en tomate son más recientes (Morales *et al*., 2002) aunque la problemática de *B. tabaci* se incrementaba en las zonas tomateras del

norte del país (Morales *et al*., 2000) y ya en el 2001 se informaba de la presencia del biotipo B de *B. tabaci*, peste del cultivo de tomate (Morales & Anderson, 2001). Estudios recientes han determinado la presencia del ToYMV altamente relacionado con el aislamiento de Venezuela, en los departamentos de Cundinamarca y Tolima (Corrales *et al*., en prensa). La diseminación del ToYMV puede estar asociada a la adaptación de *B. tabaci* biotipo B a zonas agrícolas en las que anteriormente no se encontraba presente (alturas superiores a 1500 m.sn.m.).

2.3. Mosca Blanca (*Bemisia tabaci* Genn)

La mosca blanca *B. tabaci* ha sido de gran importancia como plaga y vector de enfermedades virales de plantas alimenticias, industriales u ornamentales desde los comienzos de la década de 1980s. Se conocen a la fecha 24 poblaciones de *B. tabaci* a las que se le ha asignado un biotipo identificado con una letra, pero probablemente el número real de biotipos de *B. tabaci*, sea menos de la mitad. Estos biotipos resultan ser casi idénticos morfológicamente por los que la diferenciación ha sido basada en el rango de hospederos, la adaptabilidad planta-hospedero, la inducción de reacciones fitotóxicas, la resistencia a insecticidas, y por el ADN. El más estudiado es el biotipo B cuyas poblaciones tienen una gran capacidad de adaptación a diferentes hospederos y también transmite virus (Jones, 2003).

El biotipo B de *B. tabaci*, originario del Viejo Mundo, apareció en las Américas en el estado de Florida, USA, en 1986. Al año siguiente ya se detectaban poblaciones de las

mosca en los campo de tomate, y en 1989 se reportaba como transmisor de un geminivirus que luego fue identificado como *Tomato mottle virus* (ToMoV). Además de ser transmisor de este virus, el biotipo B fue asociado con un nuevo desorden del tomate en Florida conocido como 'maduración irregular' y 'hoja plateada' en Cucúrbitas (Morales & Anderson, 2001).

Los begomovirus son los virus más numerosos de los transmitidos por *B. tabaci* y causan pérdidas entre el 20 y el 100% en los cultivos afectados. Después de la adquisición por las moscas blancas, los begomovirus son persistentes y son retenidos por períodos en un rango de unas pocas semanas a toda la vida (Jones, 2003). En un estudio de la interacción de un begomovirus aislado de tomate con la mosca blanca (Santos *et al*., 2003), se indica que una interacción vector-begomovirus es establecida desde la fase inicial de desarrollo del insecto y se establecen que los períodos para la adquisición o transmisión del begomovirus en tomate pueden ser cortos (15 a 30 min.) reforzando la importancia de *B. tabaci* B en la rápida diseminación de virus en el campo.

2.4. Estrategias para controlar begomovirus que afectan el tomate

Varias estrategias han sido usadas en el intento por controlar los begomovirus que infectan las plantas de tomate, pero solo unas pocas de ellas han sido efectivas. Como los begomovirus no son controlados por agroquímicos, es entonces su vector, *B. tabaci*, el blanco para la mayoría de las estrategias de control. La más utilizada ha sido la aplicación de insecticidas que en muchos casos se realiza en dosis mayores a las recomendadas. Este

abuso se refleja actualmente en la resistencia de *B. tabaci* a la mayoría de insecticidas tradicionales, y el aumento en la contaminación ambiental (Morales, 2001).

Otras estrategias de control del vector incluyen el control biológico mediante hongos entomopatógenos, depredadores, y parasitoides, con resultados muy insatisfactorios en los cultivos de tomate. Las prácticas culturales, tales como uso de barreras, desecho de residuos de cultivo; uso de películas plásticas que absorben la luz ultravioleta; y mallas a prueba de insectos pueden ser efectivas pero estas prácticas tienen unos costos altos y en algunos casos, problemas por sombra, sobrecalentamiento y mala ventilación (Freitas-Astua *et al*, 2002). Por esto, el uso de plantas de tomate resistentes es sin duda la mejor manera de controlar los begomovirus. Además de la resistencia genética directa a los begomovirus, la resistencia a mosca blanca ha sido reportada en algunas especies de *Solanum* (syn. *Lycopersicon*) silvestres, tales como *S. hirsutum* y *S. peruvianum* (Morales, 2001). Sin embargo, las características asociadas con este tipo de resistencia son indeseables comercialmente.

Finalmente, una alternativa que se contempla para el control de los begomovirus en tomate es la transgénesis. Esta aproximación al mejoramiento se deriva del concepto de resistencia derivada del patógeno que se define como la transformación de plantas con fragmentos de genomas virales que pueden generar líneas de plantas resistentes. Las principales estrategias utilizadas en el control de begomovirus son agrupadas en cinco categorías: a) resistencia mediada por la cápside proteica, b) resistencia mediada por la proteína de

movimiento, c) ADN viral defectuoso de interferencia, d) genes en orientación anti-sentido y e) gen de la replicasa truncada o mutado (Freitas-Astúa et al., 2002; Lapidot & Friedman, 2002).

2.4.1. Mejoramiento tradicional

En las Américas, donde se encuentran la mayoría de begomovirus que afectan el tomate y un rango de tolerancia y resistencia amplio en la naturaleza, es poco el trabajo que se ha realizado en el mejoramiento de este cultivo. Caso contrario a lo que se presenta en el Viejo Mundo, por lo que los cultivadores de la América tropical optan por importar variedades e híbridos de tomate resistentes a los begomovirus presentes en esa región del mundo (Morales, 2001). Uno de lo begomovirus con los que más se ha trabajado en mejoramiento por su amplia distribución e importancia económica es el TYLCV. Este virus puede causar pérdidas hasta del 100% en los cultivos del Mediterráneo. Debido a que todos los cultivares de *L. esculentum* son susceptibles a este virus, los programas de mejoramiento han estado basados en la evaluación de accesiones de origen silvestre (Picó *et al*., 1998), y la transferencia de genes al tomate cultivado.

Para los begomovirus del Nuevo Mundo, en El Salvador, y Yucatán, México, se hicieron evaluaciones de genotipos de tomate como fuentes potenciales de resistencia a virus transmitidos por mosca blanca seleccionados por el Centro Asiático para el Desarrollo e Investigación de Vegetales (AVRDC) de Taiwán (Pérez & Hanson, 2004). De las líneas evaluadas, las mejoradas en Florida (FLA), fueron finalmente seleccionadas por su

resistencia a begomovirus del Nuevo Mundo antes de ser enviadas a Asia. De estas líneas, FLA 456-4 se comportó como resistente para los virus presentes en las zonas de evaluación.

La introgresión de la resistencia a algunas de las líneas FLA se hizo a partir de *L. chilense* (LA2779) y del híbrido 'Tyking'. En evaluaciones para la identificación de la resistencia al Virus del mosaico amarillo del tomate (aislamiento de Trinidad y Tobago) entre especies de *Lycopersicon*, LA 2779 y las líneas mejoradas con este genotipo fueron consideradas fuentes potenciales de resistencia. Esto fue evidenciado por el relativamente alto número de plantas asintomáticas y el atenuado promedio del puntaje dado a los síntomas (Rampersad & Umaharan, 2003). Igualmente en este estudio se observó que el híbrido 'Tyking' tuvo los puntajes más bajos de severidad de los síntomas entre los cultivares comerciales. Una línea F_6 derivada de este híbrido, ´TX 468-RG´ fue evaluada para determinar la herencia de la resistencia a un begomovirus bipartito en Brasil (Giordano *et al*., 2005). Se reporta la presencia del locus, que ellos denominaron *tcm*-1 (*tomato chlorotic mottle virus resistance* -1), en la línea y se propuso un modelo de herencia monogénico aparente. Se ha observado además que las líneas comerciales de tomate que llevan este locus *tcm*-1 muestran aparentemente un amplio espectro de resistencia como lo han indicado estudios con diferentes aislamientos de begomovirus en Brasil (Santana *et al*., 2001)

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización

El trabajo se realizó en el laboratorio e invernaderos de la Unidad de Virología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia. La evaluación de campo fue realizada en el campo experimental de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira (CEUNP)

3.2. Germoplasma Vegetal

Las semillas de tomate de la variedad Unapal Maravilla se obtuvieron del CEUNP. Las semillas de las líneas FLA 496-11-6-1-0, FLA 478-6-3-1-11, FLA 456-4, FLA 653-3-1-0 previamente evaluadas para resistencia a begomovirus, y CLN 206 D, evaluada como susceptible, fueron proporcionadas por el Centro Asiático para el Desarrollo e Investigación de Vegetales (AVRDC) y las semillas del híbrido Kyndio fueron adquiridas comercialmente (Semillas Arroyave). Las semillas fueron germinadas en bandejas bajo condiciones de invernadero y se trabajó con plántulas en la etapa de 2 hojas verdaderas.

3.3. Fuente del Virus

El aislamiento del virus que se utilizó para la evaluación de los materiales se obtuvo de plantas de tomate sintomáticas provenientes de Rozo (Valle del Cauca). El aislamiento fue detectado y caracterizado molecularmente (sección 4.3.) y se mantuvo en el invernadero de la Unidad de Virología del CIAT por transmisión con mosca blanca (*B. tabaci*, biotipo B) a plantas de tomate hib. Kyndio mantenidas en jaulas a prueba de insectos. Las plantas se renovaban periódicamente según el ciclo de vida de la mosca blanca.

Igualmente se evaluó la posibilidad de transmitir mecánicamente el virus en materiales de tomate hib. Kyndio y fríjol (*Phaseolus vulgaris*) para permitir un manejo más practico del virus en invernadero. La transmisión se hizo impregnando en las hojas, a las que previamente se les ha aplicado carborundum, un macerado de tejido infectado con ayuda de un isótopo de algodón. A los 15 días se evaluó la presencia de sintomatología viral.

3.3. Caracterización Molecular del Virus

Se hizo extracción de ADN de hojas jóvenes de tomate según el método de Gilbertson *et al*. (1991). Para la detección del virus se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) con las pareja de cebadores degenerados específicos para geminivirus PAR1c715 (5'-GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA-3') y PAL1v1978 (5'-GCATCTGCAGGCCCACATYGTCTTYCCNGT-3') (Figura 1) que se alinean en el ADN-A dentro del gen que codifica para la proteína asociada a la replicación y del gen que codifica para la proteína de la cápside, amplificando un fragmento de aprox. 1600 pb. Para el ADN-B se utilizó la pareja de cebadores PCRc2 (5'-

CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCC-3’) y PBL1v2040 (5’-GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA-3’) (Figura 1) que se alinean a la cadena en sentido complementario de la forma replicativa del gen que codifica para la proteína de movimiento célula a célula amplificando un fragmento de aprox. 500 pb. (Rojas *et al*, 1993). La mezcla de reacción se utilizó a las concentraciones finales: Buffer 1X, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM cada uno, cebadores 0.2 µM de cada uno y 1 U de Taq polimerasa (Promega, Madison, WI). Las condiciones de amplificación incluyen un primer ciclo de denaturación a 94 ˚C por 1 min., alineamiento de los cebadores a 52 ˚C por 90 s y extensión a 72 ˚C por 90s; seguido de 30 ciclos de 94 ˚C por 30s, 52 ˚C por 1 min. y 72 ˚C por 1 min; con una extensión final de 5 min a 72 ˚C. Se utilizaron como control positivo muestras de ADN donde previamente se había detectado un begomovirus y como control de reacción se utilizó la mezcla de reacción sin ADN.

Los productos amplificados fueron observados en geles de agarosa al 1.2 %, teñidos en una solución de bromuro de etidio (10 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml por cada 100 ml de agua estéril) y visualizados en luz ultravioleta confirmando que las bandas observadas fueran del tamaño esperado, iguales a las de los controles positivos.

Para la caracterización total del componente A del begomovirus se utilizaron además las parejas de cebadores PAR1C496 (5'-AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG-3') /PAL1v1978 (Rojas *et al*, 1993) y PAL1c1960 (5'-TGGACTGCAGACNGGNAARACNATGTGGGC-3') /PAR1v722 (5'-ATATCTGCAGGGNAARATHTGGATGGA-3') (Zhou *et al*., 1997) (Figura 1) Al igual

que las amplificaciones obtenidas con los cebadores PAR1c715/ PAL1v1978 los amplificados fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) que se utilizó para transformar células competentes DH5α preparadas en el laboratorio de la Unidad de Virología del CIAT. Para las colonias positivas se purificaron los plásmidos con el Kit QIAprep (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) que fueron secuenciados utilizando los cebadores M13 y T7 y el Kit Big-Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un secuenciador automático ABI Prism -377 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias fueron editadas en el programa SEQUENCHER 4.6 y se formaron grupos de secuencias, *contigs*, donde se reconstruyó la totalidad del ADN-A del begomovirus, detectando los genes y las proteínas para las que codifican. La totalidad de la secuencia y las secuencias parciales para cada uno de los genes fueron comparadas mediante el algoritmo blast con la base de datos del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

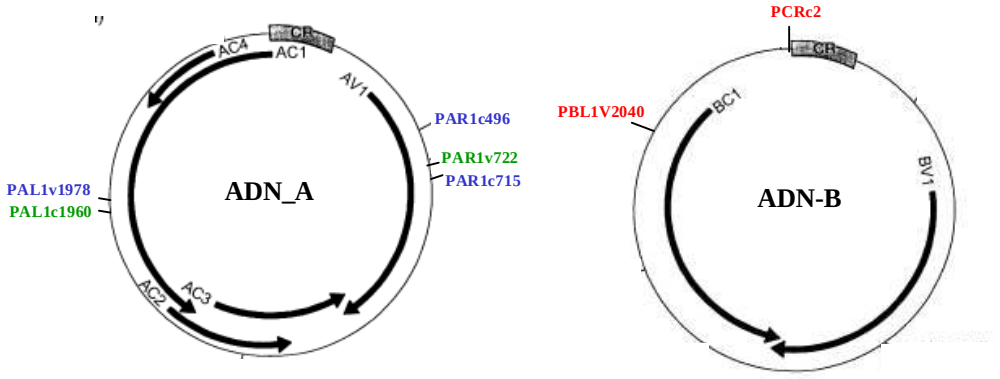

Figura 1. Mapa genómico de los begomovirus mostrando las parejas de cebadores utilizadas para el ADN-A (PAR1c496/PaL1v1978, PAR1c715/PAL1v1978, PAR1v722/PAL1c1960) y el ADN-B (PCRc2, PBL1v2040). AV1- gen de la proteína de la cápside, AC1- Gen de la replicasa, AC2- Gen involucrado indirectamente en el movimiento sistémico del virus, AC3- gen implicado en la eficiencia de la replicación viral, BC1, BV1- genes requeridos para el movimiento sistémico del virus., CR- región común.

3.4. Evaluación de la resistencia de las líneas al begomovirus.

3.4.1. Inoculación en jaula individual.

Para la evaluación de la resistencia de las líneas al begomovirus seleccionado, se estandarizó previamente el método de inoculación en jaula individual mediado por mosca blanca. Se buscó determinar cuántas moscas por planta se deben utilizar para lograr una incidencia del 70-100% de la enfermedad. Para ello, se montó un ensayo completamente al azar donde se evaluaron diferentes números (5, 10, 15 y 20) de individuos del biotipo B de *B. tabaci* por planta. Por cada tratamiento se utilizaron 10 plantas de tomate de la variedad susceptible Unapal Maravilla, de 20 días de edad. El método consistió en confinar las moscas junto con la planta utilizando jaulas individuales (cilindros fabricados con acetato de 8 cm de diámetro y 11 cm de alto tapados en uno de los extremos con tul pintado de negro). Las moscas utilizadas para la inoculación fueron tomadas por succión de la colonia virulenta mantenida en el invernadero y colocadas en la planta junto con el tubo colector (Figura 2). A las 48 horas, se desmontaron las jaulas, retirando por succión las moscas de cada una de las plantas y esperando el desarrollo de los síntomas. Semanalmente, por tres veces y después de quince días de la inoculación, se monitoreó el progreso de la enfermedad, la incidencia medida como el porcentaje de plantas infectadas por tratamiento y la presencia del virus utilizando las técnicas de PCR y *dot blot* (ver Detección del begomovirus 4.4.2.).

Figura 2. Montaje de inoculación en Jaula Individual. En la foto se muestra el tubo de acetato donde se colectaron las moscas junto a la plántula encerrados en la jaula de acetato tapada con tul.

La presencia del virus también fue confirmada por PCR en algunas moscas escogidas al azar de las recuperadas del ensayo.

Estandarizado el proceso de inoculación, se evaluaron las líneas FLA 496-11-6-1-0, FLA 478-6-3-1-11, FLA 456-4, FLA 653-3-1-0 y CLN 206 D; el híbrido Kyndio y la variedad Unapal Maravilla, siguiendo el mismo procedimiento. Se realizó una primera evaluación del 30 de marzo al 27 de Abril donde se determinó la incidencia y se detectó la presencia del virus. En una segunda evaluación, realizada del 22 de agosto al 19 de septiembre, se busco optimizar la evaluación incluyendo una escala de severidad y haciendo ajustes en los métodos de detección. Para evaluar la severidad se utilizó una escala previamente reportada (Piven *et al*., 1995) (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de evaluación de severidad de síntomas (Piven *et al*., 1995).

Puntaje	Descripción de síntomas
0	no síntomas
1	síntomas leves visibles solo después de una búsqueda cuidadosa.
2	síntomas leves pero más visibles
3	síntomas moderados sobre la mayoría de la planta.
4	síntomas severos en la totalidad de la planta.

Se realizó análisis de varianza con los resultados obtenidos utilizando el paquete estadístico SAS versión 7 para windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.4.2. Detección molecular del virus

Para la detección molecular del virus en las plantas inoculadas y en las moscas utilizadas para la transmisión se utilizaron las técnicas de PCR e hibridación *dot blot.*

3.4.2.1. PCR

El PCR de detección se hizo según lo ya mencionado en la sección 4.3. con las parejas de cebadores PAR1c715/PAL1v1978 el ADN-A. Para el material vegetal se hizo extracción de ADN a partir de hojas jóvenes según el método de Giltberson *et al*. (1991). Se incluyeron muestras de plantas sanas como control negativo y hojas de plantas susceptibles infectadas como control positivo. Los ADNs fueron visualizados en un gel de agrosa al 1% y cuantificados con ayuda de un espectrofotómetro AQUAMATE (Thermo Electron

Corporation). Se hicieron diluciones a 20 ng/µl para trabajar con 100 ng totales en la reacción de PCR. Para el caso de las moscas, recuperadas por succión, se hizo extracción individual de ADN según el método de De Barro & Driver (1997) con algunas modificaciones. Cada mosca, colocada en un eppendorf de 1.5 ml, se maceró con un pistilo de vidrio humedecido con el buffer de lisis (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8.4 10 mM, Tween 20 0.45%, NP-40 0.45%, proteinasa K 500 µg/ml) y se agregaron 20 µl del mismo buffer. Se incubó a 65 ºC por 20 min con una denaturación final por 10 min a 94 ºC. Finalmente se agregaron 25 µl de agua bidestilada estéril, utilizando 5 µl por reacción de PCR.

3.4.2.2. *dot-blot*

Fragmentos de hojas jóvenes de las plantas a evaluar fueron macerados en 200 µl de NaOH 0.4 N. Igualmente que en el PCR, se incluyeron controles positivos y negativos. Dos microlitros del macerado de cada muestra fueron punteados en membrana de nylon (Hybond N^+- Amersham). La membrana fue tratada sumergiéndola por 5 min en una solución de Tris 1M (pH 7.4), NaCl 0.5 N y por 5 min en etanol al 95 %, para eliminar el color verde de los puntos. Después de secar la membrana se fijó el ADN utilizando luz ultravioleta y se hibridó según las instrucciones del Kit Dig High Prime DNA Labeling and Detection Kit II (Roche, Penzberg, Germany) que usa la digoxigenina para marcar las sondas de ADN para la hibridación y subsiguiente detección de quimioluminiscencia por inmunoensayos enzimáticos. La sonda utilizada para la detección fue generada a partir del clon obtenido de la caracterización molecular parcial del begomovirus. Se hizo una amplificación a partir del ADN plasmídico con los cebadores PAR1c715/PAL1V1978. El

producto fue purificado del gel utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) y fue marcado según instrucciones del Kit de hibridación. El resultado de la hibridación fue observado en películas fotográficas donde se detectó la reacción de luminiscencia.

Para una segunda evaluación de las líneas se realizaron las siguientes modificaciones al protocolo anteriormente descrito: (1) se partió de aproximadamente 5 mg de tejido macerado con nitrógeno líquido que se homogenizó con 50 µl de NaOH 0.4N y (2) Se puntearon 5 µl de cada muestra en la membrana.

3.5. Evaluación agro-morfológica de las líneas

La evaluación se hizo en CEUNP bajo un diseño de bloques completos al azar con 3 repeticiones, cada repetición con 5 plantas. Las plántulas, producidas bajo condiciones de invernadero utilizando semillas tratadas con termoterapia y protegidas con vitavax, fueron sembradas en el campo a los 20 días de edad.

Se tomaron datos de rendimiento, pesando la totalidad de los frutos producidos por planta, y las medidas de longitud, ancho, peso y número de lóculos del fruto en 5 frutos por cada planta. Además, se hizo el conteo del número de flores por inflorescencia en la segunda inflorescencia de la planta (IPGRI, 1996). Los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico SAS versión 7 para windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización molecular del virus

Se obtuvo un *contig* de 2596 nucleótidos que comprende en su totalidad el ADN-A del aislamiento del begomovirus utilizado en este estudio (Figura 3). Este aislamiento mostró para toda su longitud una identidad nucleotídica del 91% con el Virus del mosaico amarillo del tomate (*Tomato yellow mosaic virus*- ToYMV), aislamiento de Guadalupe. Al comparar la secuencia de aminoácidos, la identidad para el gen de la replicasa fue del 90% con el mismo virus, y para la proteína de la cápside del 98%, similitud compartida con los aislamientos de ToYMV de Panamá, Guadalupe y Venezuela. Para el clon de 600 pb, obtenido de la amplificación del ADN-B del begomovirus, se confirma la presencia del ToYMV al obtener una identidad a nivel de aminoácidos del 98% con la proteína de movimiento viral.

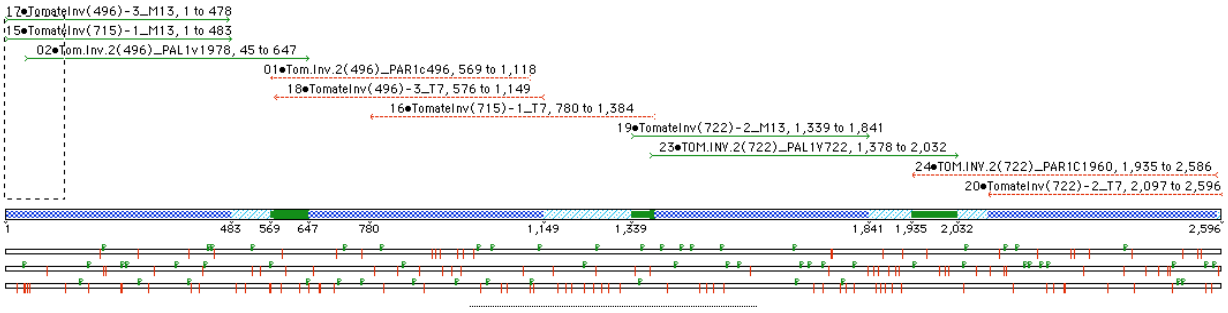

Figura 3. *Contig* de secuencias elaborado con el programa *Sequencher* 4.6, mostrando la secuencia total (2596 nt.) del ADN-A del virus caracterizado.

4.2. Estandarización del método de inoculación.

De los tratamientos evaluados (5, 10, 15 y 20 moscas por planta) según los síntomas observados se estableció que el mejor tratamiento fue el de 10 moscas por planta con una incidencia del 80%. Para los tratamientos de 5, 15 y 20 moscas se obtuvo una incidencia del 20%, 30% y 30%, respectivamente. Estos resultados fueron confirmados al hacer la detección del virus por *dot blot* (Tabla 2, Figura 4).

Tabla 2. Resultados de la estandarización del método de inoculación en jaula individual.

Tratamiento[1]	**Evaluaciones**		**Numeración en la membrana**
	Síntomas	***dot blot***	
5-10	**+**	**+**	**1**
5-8	-	-	2
5-9	-	-	3
5-7	-	-	7
5-2	-	-	8
5-4	-	-	17
5-3	-	-	18
5-6	-	-	25
5-1	-	-	29
5-5	**+**	**+**	**34**
10-5	**+**	**+**	**6**
10-9	**+**	**+**	**11**
10-1	-	-	15
10-7	**+**	**+**	**19**
10-3	**+**	**+**	**20**
10-8	-	-	28
10-10	**+**	**+**	**32**
10-6	-	-	33
10-2	**+**	**+**	**35**
10-4	**+**	**+**	**40**
15-3	-	-	5
15-9	-	-	10
15-10	**+**	**+**	**13**
15-8	-	-	16
15-2	-	-	21

Tabla 2. Continuación.

15-7	**+**	**+**	**22**
15-6	-	-	23
15-1	-	-	26
15-5	**+**	**+**	**38**
15-4	-	-	39
20-6	-	-	4
20-4	-	-	9
20-7	-	-	12
20-2	-	-	14
20-3	-	-	24
20-10	**+**	**+**	**27**
20-9	-	-	30
20-5	-	-	31
20-1	**+**	**+**	**36**
20-8	**+**	**+**	**37**

[1]El primer número corresponde al tratamiento 5, 10, 15 o 20 moscas por planta; el segundo número corresponde a la repetición.

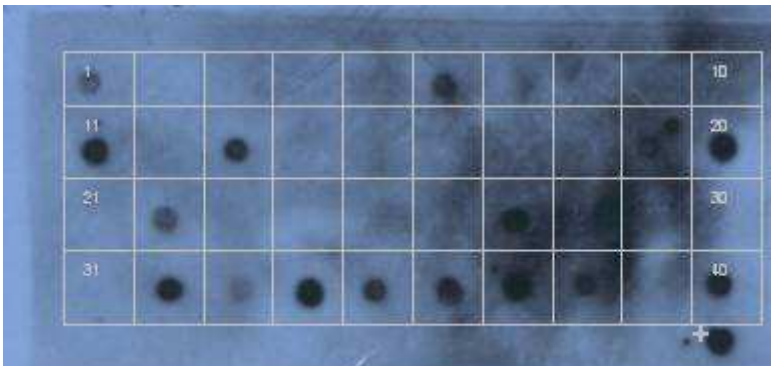

Figura 4. Hibridación *dot blot* de hojas jóvenes de tomate var. Unapal Maravilla, después de 45 días de la inoculación con moscas blancas infectadas con begomovirus. Los números en los recuadros indican los números asignados en el laboratorio (Tabla 2); (+) Control enfermo.

Con el tratamiento de 10 moscas por planta además se logró un buen desarrollo de los síntomas de mosaico, amarillamiento y distorsión foliar (Figura 5).

Figura 5. Planta de Unapal Maravilla inoculada con el ToYMV utilizando 10 moscas en jaula individual. Se observan los síntomas de mosaico amarillamiento y un ligero arrugamiento foliar.

Las pruebas de inoculación mecánica del virus en tomate hib. Kyndio y en fríjol resultaron negativas; no se observaron los síntomas esperados después de evaluaciones realizadas a partir de los 15 días de la inoculación (resultados no mostrados).

4.3. Evaluación de la resistencia al begomovirus.

Se realizaron dos evaluaciones en el invernadero separadas temporalmente. La primera se realizó, del 30 de marzo al 27 de Abril de 2007, bajo unas condiciones promedio de temperatura de 28.5 °C en el día y 24 °C en la noche y una humedad del 80%. Los resultados de incidencia y detección del virus por PCR y *dot blot* se resumen en la tabla 3.

Para esta primera evaluación se observó que la incidencia de la enfermedad aumentó a medida que pasaron los días después de la inoculación. Solo para el genotipo FLA 456-4 no se observaron plantas con síntomas en ninguna de las observaciones con una incidencia del 0%. Los genotipos susceptibles hib. Kyndio y var. Unapal Maravilla alcanzaron una incidencia del 100%; CLN 2026D, previamente reportado como susceptible (Pérez & Hanson, 2004) tuvo un 50% de plantas infectadas. En contraste, los genotipos FLA 478-6-3-1-11 y FLA 496-11-6-1-0 solo alcanzaron una incidencia del 10 % y el genotipo FLA 653-3-1-0 de un 20%.

Tabla 3. Primera evaluación de la respuesta de los genotipos a la inoculación en jaula individual del begomovirus ToYMV.

Genotipo [2]	**14 DDI**[1]			**21 DDI**			**28 DDI**		
	Incidencia (%)	**Plantas con virus (%)**		**Incidencia (%)**	**Plantas con virus (%)**		**Incidencia (%)**	**Plantas con virus (%)**	
		PCR	***dot blot***		**PCR**	***dot blot***		**PCR**	***dot blot***
FLA 653-3-1-0	0	0	0	20	0	0	20	0	0
CLN 2026D	20	20	20	40	0	20	50	10	20
FLA 456-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kyndio	80	20	20	90	0	20	100	10	20
FLA 478-6-3-1-11	0	10	10	0	10	10	10	10	10
FLA 496-11-6-1-0	0	0	10	10	10	0	20	10	10
Unapal-Maravilla	100	50	50	100	10	50	100	0	50

[1] DDI- Días después de la inoculación.
[2] El número de plantas evaluadas fue diez por genotipo.

En cuanto a la detección del virus, en general no se observó una relación entre el porcentaje de plantas infectadas y el porcentaje de plantas donde se detectó el virus para ninguna de las dos técnicas (PCR y *dot blot*). Con la técnica *dot blot*, sin embargo, se detectó el virus en un mayor número de plantas que la técnica de PCR, este resultado fue

consistente para las tres observaciones después de la inoculación (Figura 6). La técnica de PCR no fue tan sensible y además no hubo reproducibilidad de los resultados en el tiempo.

Como se esperaba una alta correlación de los resultados de incidencia con los de detección del virus, se hizo una segunda evaluación para confirmar los resultados obtenidos. Este ensayo se realizó, del 22 de agosto al 19 de septiembre de 2007, con una temperatura promedio de 28 °C en el día y 23 °C en la noche y humedad del 80 %. Los resultados se observan en la tabla 4, donde se reportan los valores de incidencia, severidad y porcentaje de plantas con virus detectadas por *dot blot*.

En esta segunda evaluación se observó que los valores de incidencia, medidos como el porcentaje de plantas afectadas según la observación de síntomas, son altos. Desde los 14 días después de la inoculación (DDI), Kyndio y Unapal-Maravilla ya habían alcanzado un 100% de incidencia. Este mismo porcentaje se presentó a los 28 DDI en las líneas FLA 653-3-1-0 y CLN2026D, reportada previamente como susceptible. La línea FLA 478-6-3-1-11 tuvo el valor más bajo con un 30% de las plantas con síntomas, seguido por las líneas FLA 496-11-6-1-0, y FLA 456-4 donde se observaron incidencias del 66, y 70%, respectivamente.

A

B

C

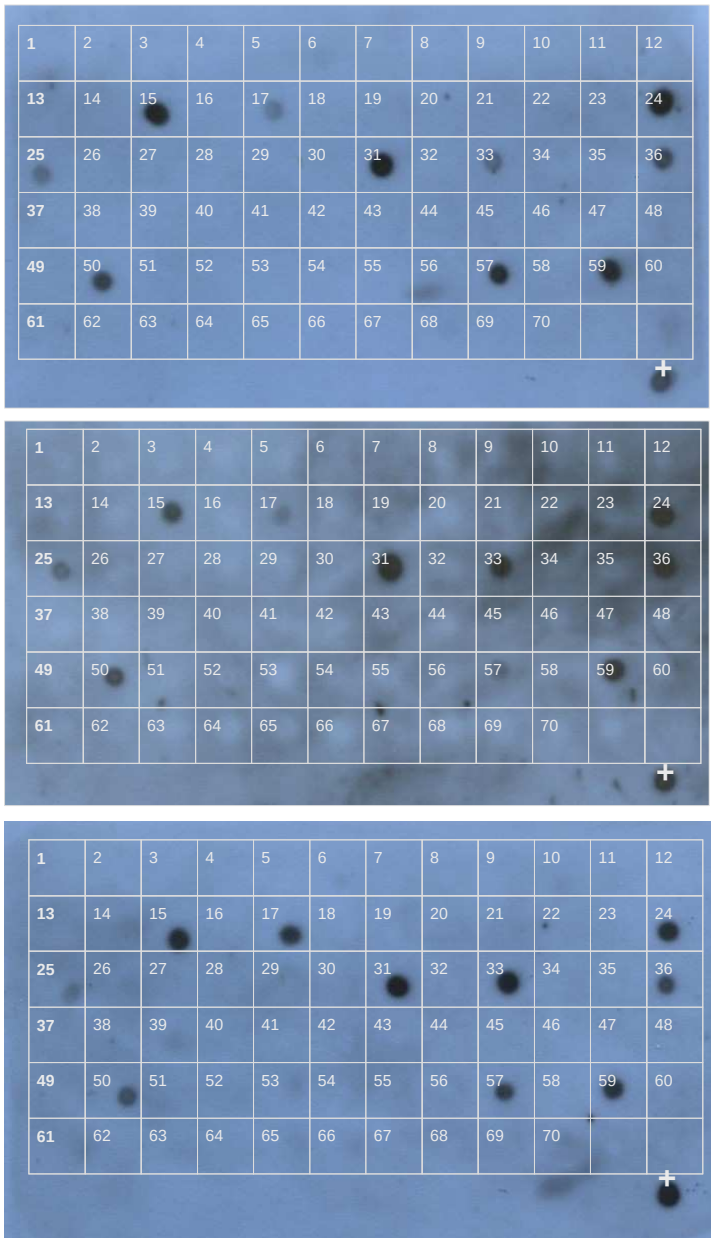

Figura 6. Primera Evaluación. Hibridación *dot blot* de hojas jóvenes de materiales de *Solanum* spp. inoculados con ToYMV. A- 14 días después de la inoculación (DDI), B- 21 DDI, C- 28 DDI. Cada punto corresponde a una repetición; los puntos negros indican la presencia de ADN viral. FLA 478-6-3-1-11 (5,9,18,22,25,40,44,58,63,69), var. Unapal Maravilla (12,15,17,19,33,35,49,50,54,57), FLA 653-3-1-0 (1,10,20,28,29,34,38,46,60,64), FLA 456-4 (3,21,23,30,37,39,51,62,65,67), FLA 496-11-6-1-0 (6,8,13,16,42,43,48,52,61,68), CLN 206 D (2,11,24,32,41,47,55,56,59,70), hib. Kyndio (4,7,14,26,27,31,36,45,53,66), (+)- control enfermo.

Tabla 4. Segunda evaluación de la respuesta de los genotipos a la inoculación en jaula individual del begomovirus ToYMV.

Genotipo[2]	14 DDI[1]			21 DDI			28 DDI		
	Incidencia[3]	P.V.[4]	Sever.[5]	Incidencia	P.V.	Sever.	Incidencia	P.V.	Sever.
FLA 478-6-3-1-11	30	0	0,3	30	0	0,3	30	0	0,3
FLA 496-11-6-1-0	66	0	0,8	66	16	0,8	66	33	1
CLN 2026D	50	40	1,3	90	70	1,7	100	70	2,5
Kyndio	100	70	2,8	100	80	3	100	80	3,5
FLA 456-4	70	10	0.9	70	50	0,8	70	100	0,7
Unapal-Maravilla	100	60	2,9	100	60	3,1	100	60	3,4
FLA 653-3-1-0	20	0	0,2	40	20	0,4	100	20	1

[1] DDI- Días después de la Inoculación
[2] El número de plantas evaluadas fue diez por genotipo, exceptuando FLA 496-11-6-1-0 y FLA 653-3-1-0 para las que se utilizó 6 y 5 plantas respectivamente.
[3] Porcentaje de plantas infectadas basado en los síntomas
[4] Porcentaje de plantas con virus basado en la hibridación *dot blot*
[5] Valores promedio según escala de evaluación (Tabla 1).

A pesar que los valores de incidencia son altos, los índices de severidad muestran las diferencias en las respuestas de los diferentes genotipos a la inoculación. Por ejemplo, para la línea FLA 653-1-0 al final de la evaluación se observó que la totalidad de las plantas evaluadas presentaban síntomas pero el índice de severidad promedio solo fue de 1; esto significa que los síntomas observados eran perceptibles solo después de una evaluación muy cuidadosa. Caso contrario sucede con la variedad Unapal Maravilla y el híbrido Kyndio donde igualmente hay una incidencia del 100% pero los índices de severidad son del 3,4 y 3,5, respectivamente. Estos valores se vieron reflejados en síntomas moderados a severos de mosaico, amarillamiento y distorsión foliar que eran evidentes en toda la planta.

En los análisis de varianza que se realizaron para el índice de severidad para cada uno de los tres días de evaluación (14, 21 y 28 DDI) se observó que, con una confiabilidad del

95%, hubo diferencias significativas entre los genotipos evaluados. Las pruebas de Duncan de comparación de medias muestran que a partir de los 21 DDI se forma un grupo compuesto por Unapal-Maravilla y Kyndio con una severidad promedio de 3.0, un segundo grupo conformado por la línea CLN 2026D con una severidad de 1.7 y finalmente un tercer grupo que reúne todas las líneas FLA con una severidad inferior a 1.0 (Ver Anexo A y B).

En cuanto a la detección del virus, la correlación general entre el porcentaje de plantas con síntomas y el porcentaje de plantas donde se detectó el ADN viral por la técnica *dot blot* fue de un 73%. A pesar de que no existió una correlación del 100%, los resultados obtenidos reflejan la reacción de las plantas a la inoculación viral. Para las líneas FLA 653-3-1-0 y FLA 496-11-6-1-0 se observó que la detección del virus se hizo solo después de los 21 DDI y en un porcentaje bajo. Para línea FLA 478-6-3-1-11 que tuvo la menor incidencia y el menor valor de severidad, no se detectó el virus en ninguna de las plantas evaluadas. En la línea FLA456-4 el porcentaje de plantas detectadas con virus (100%) fue mayor que la incidencia (70%). Para los genotipos susceptibles Unapal Maravilla y Kyndio, como se había anotado previamente, se tuvieron valores de incidencia del 100% desde los 14 DDI pero no se registraron los mismos valores de detección del virus, aunque en Kyndio se alcanza una detección del 80% de las plantas. La línea CLN2026D también alcanza el 100% de las plantas infectadas a los 28 DDI y se detecta el virus por *dot blot* en el 70% de ellas.

La detección del virus se realizó además con la técnica de PCR y se compararon los resultados con la técnica *dot blot*, los resultados se muestran en la tabla 5. En general la técnica *dot blot* fue mucho más sensible y reproducible en el tiempo, en un planta en la que se hizo detección a los 14 DDI se pudo hacer la detección del virus hasta el final de la evaluación (28 DDI) (Figura 7). Para la evaluación con PCR, al contrario, se observó como la eficiencia de detección va disminuyendo, observándose los menores porcentajes de plantas detectadas a los 28 DDI. La correlación general entre el porcentaje de plantas con síntomas y el porcentaje de plantas en las que se detecta el virus fue del 68%.

Tabla 5. Detección de plantas con ADN viral con las técnicas de PCR y *dot blot* para la segunda evaluación de la respuesta de los genotipos a la inoculación en jaula individual del begomovirus ToYMV.

	14 DDI[1]		**21 DDI**		**28 DDI**	
Genotipo[2]	**PCR[3]**	***dot blot***	**PCR**	***dot blot***	**PCR**	***dot blot***
FLA 478-6-3-1-11	0	0	0	0	0	0
FLA 496-11-6-1-0	0	0	33	16	16	33
CLN 2026D	40	40	30	70	10	70
Kyndio	60	70	70	80	40	80
FLA 456-4	0	10	10	50	0	100
Unapal-Maravilla	50	60	60	60	20	60
FLA 653-3-1-0	0	0	0	20	0	20

[1]DDI- Días después de la Inoculación
[2] El número de plantas evaluadas fue diez por genotipo, exceptuando FLA 496-11-6-1-0 y FLA 653-3-1-0 para las que se utilizó 6 y 5 plantas respectivamente.
[3] Para las dos técnicas se reporta el porcentaje de plantas en las que se detecta ADN viral.

La presencia del virus en las moscas blancas también fue confirmada. Se evaluaron 100 moscas blancas elegidas al azar, recuperadas del ensayo de inoculación, encontrando que el 60% de las moscas evaluadas tenían el virus.

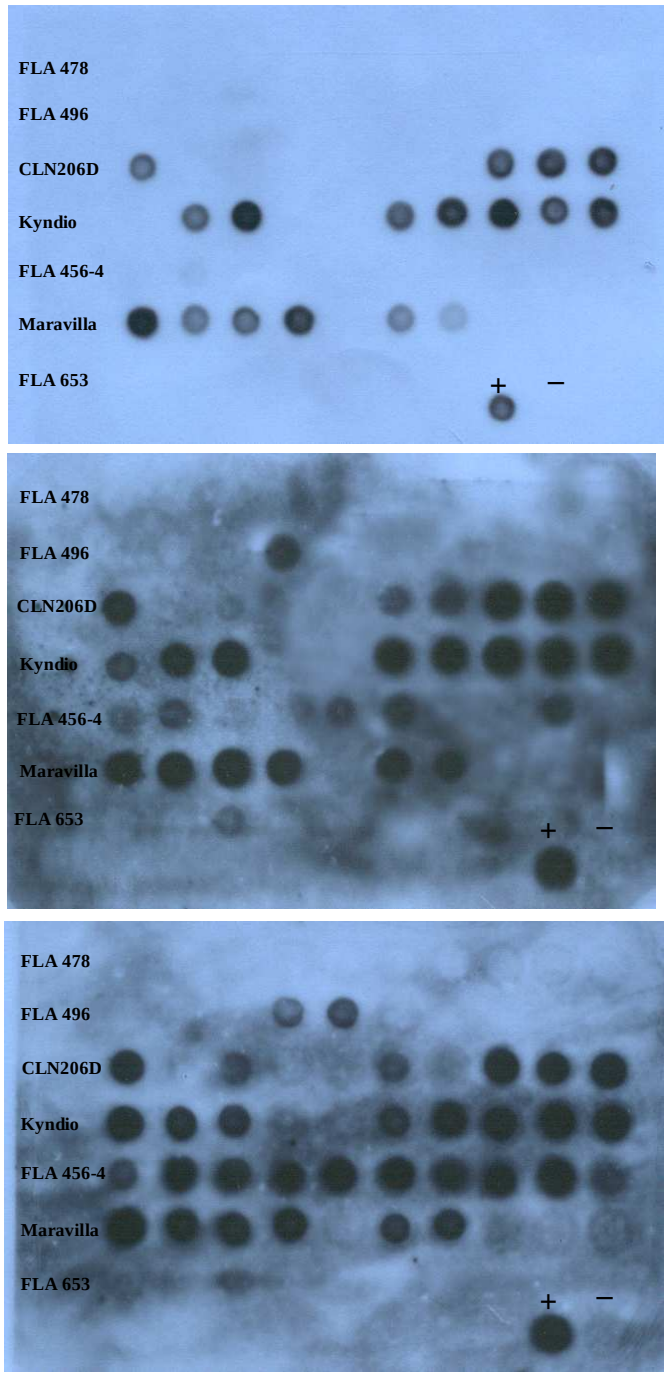

Figura 7. Segunda Evaluación. Hibridación *dot blot* de hojas jóvenes de materiales de *Solanum* spp. inoculados con ToYMV. A- 14 días después de la inoculación (DDI), B- 21 DDI, C- 28 DDI. Cada punto corresponde a una repetición; los puntos negros indican la presencia de ADN viral. (+) control enfermo, (-) control sano.

4.4. Evaluación agro-morfológica

Los genotipos fueron evaluados en campo entre los meses de abril y julio de 2007, bajo unas condiciones de precipitación promedio diaria de 2.8 mm con un total acumulado de 338.9 mm para los 4 meses, y una temperatura media promedio de 23 °C. Los resultados obtenidos se vieron fuertemente afectados, durante toda la época de cosecha, por el barrenador del fruto (*Neoleucinodes elegantalis*), para el cual todos los genotipos resultaron susceptibles.

El análisis de varianza del ensayo montado en campo mostró que, con una confiabilidad del 95%, el bloqueo no era necesario en las condiciones en las que se desarrollo el ensayo, sin embargo, se lograron observar diferencias significativas entre los tratamientos (genotipos evaluados) para las diferentes variables evaluadas (ver Anexo C). En la tabla 6 se resumen los datos tomados en campo para las características del fruto y producción por planta. Como dato asociado a la producción por planta se hizo el conteo del número de flores de la segunda inflorescencia. Se encontró que en promedio, FLA 653-3-1-0 y CLN 2026D tienen diez flores por inflorescencia, el híbrido Kyndio ocho, la variedad Unapal Maravilla seis al igual que las líneas FLA496-11-6-1-0 y FLA 456-4 y finalmente, la línea FLA 478-6-3-1-11 cuatro.

Tabla 6. Evaluación en campo del rendimiento y formato del fruto de los genotipos evaluados para la resistencia al ToYMV.

Genotipo	Ancho[1]	Longitud	Peso	No. lóculos[2]	Prod/planta (Kg)
FLA 478-6-3-1-11	67.3	61.6	182.8	5	1.53
FLA 496-11-6-1-0	67.7	62.5	169.6	4	2.01
FLA 653-3-1-0	62.1	64.2	147.1	3	1.89
Kyndio	54.5	62.3	117.6	3	2.26
Unapal-Maravilla	51.9	58.8	98.7	3	1.80
CLN 2026D	49.6	57.3	88.2	2,5	1.35
FLA 456-4	44.5	39.3	55.4	3	1.80

[1] Se reportan los promedios en centímetros de las medidas para ancho, longitud y peso de los frutos.
[2] Se reporta el promedio del conteo del número de lóculos por fruto de 20 frutos.

Al evaluar las características de los frutos se encontró que la línea con el mayor peso del fruto fue FLA 478-6-3-1-11 con 182.8 g, con una longitud y ancho promedio de 61.6 cm. y 67.3 cm., respectivamente. Sin embargo, esta línea tuvo una de las producciones más bajas, 1.53 Kg/planta. En contraste, la línea FLA 456-4 tuvo los frutos de menor tamaño (longitud 39.3 cm., ancho 44.5 cm. y peso 55.4g) pero su producción fue de 1.8 Kg/planta. El híbrido Kyndio tuvo la mayor producción con 2.26 Kg/planta.

Según los descriptores para el tomate dado del IPGRI (1996), las variedades comerciales utilizadas como control tienen un formato de fruto tipo redondo-alargado (chonto), al igual que la línea CLN2026D. Las líneas FLA 478-6-3-1-11, FLA 496-11-6-1-0 y FLA 653-3-1-0 tienen un formato de fruto ligeramente achatado, y la línea FLA 456-4 un formato redondeado. Esta línea se caracterizó además por tener frutos de color naranja a diferencia de los demás genotipos que presentaron frutos de color rojo (Figura 8).

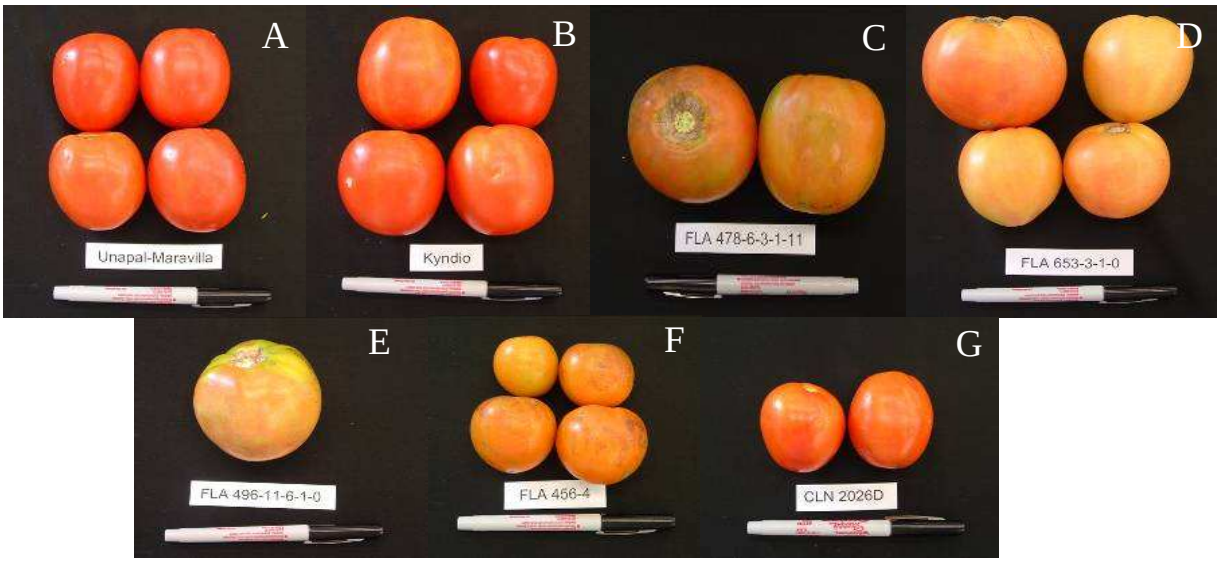

Figura 8. Frutos de los materiales de *Solanum* spp. evaluados para la resistencia a begomovirus. A- var. Unapal Maravilla, B- hib. Kyndio, C- FLA 478-6-3-1-11, D- FLA 653-3-1-0, E- FLA 496-11-6-1-0, F- FLA 456-4 y G- CLN 206 D.

A pesar de la alta precipitación que se presentó a lo largo del ensayo, poblaciones de mosca blanca fueron observadas hacia el final del ciclo del cultivo y con ella algunos síntomas virales. Se evaluó, aunque no era el objetivo, la respuesta de los genotipos a la infección natural con el virus. La incidencia de la enfermedad fue bastante clara en Unapal Maravilla y Kyndio donde se observaron síntomas de mosaico generalizado pero moderado, la línea CLN2026D fue la más afectada presentando un amarillamiento intenso, deformación de las hojas hacia arriba (concavidad) , necrosis foliar y finalmente muerte de la planta (Figura 9). En las otras líneas (FLA 478-6-3-1-11, FLA 496-11-6-1-0, FLA 653-3-1-0 y FLA 456-4) no se observaron síntomas de tipo viral que estuvieran afectando las plantas.

Figura 9. Síntomas virales observados en campo en la línea CLN2026D (A) y la variedad Unapal-Maravilla (B).

Al hacer detección del virus por *dot blot* en plantas adultas (Figura 10), se encontró que del 92-100% de las plantas de Unapal Maravilla, Kyndio y la línea CLN 2026D tenían presente ADN del virus. Por el contrario, en ninguna de las plantas evaluadas para las líneas FLA 653-3-1-0 y FLA 496-11-6-10 se detectó ADN viral. Para la línea FLA 456-4 solo se detectó el 10% y para la línea FLA 478-6-3-1-11 un 50%.

Igualmente se hizo detección por PCR del virus en 100 moscas blancas colectadas al azar en campo, y se encontró que el 35% de ellas presentaba el virus.

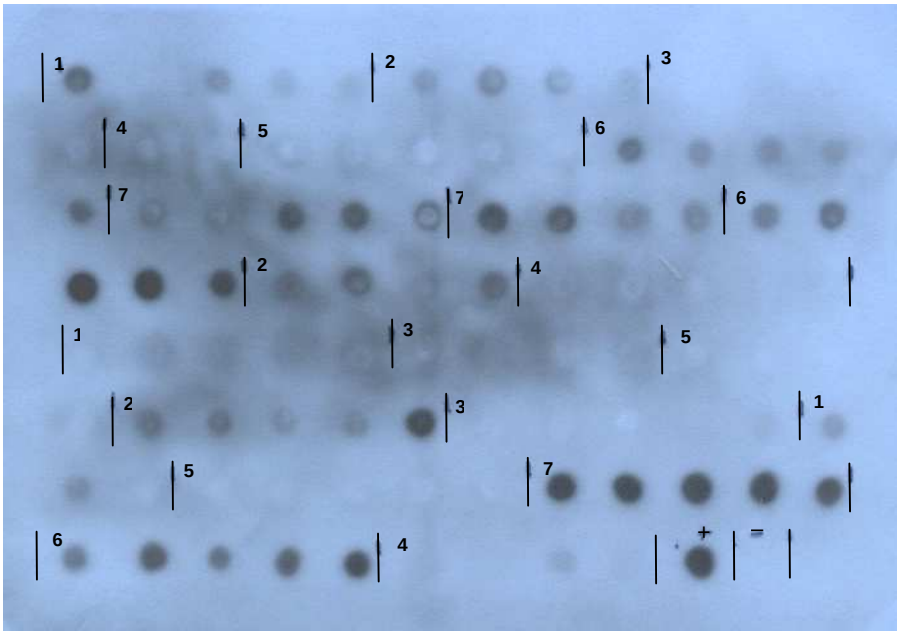

Figura 10. Hibridación *dot blot* de hojas jóvenes de materiales de *Solanum* spp. evaluadas en campo e inoculadas naturalmente. 1. FLA 478-6-3-1-11, 2. var. Unapal Maravilla, 3. FLA 653-3-1-0, 4. FLA 456-4, 5. FLA 496-11-6-1-0, 6. CLN 206 D, 7. hib. Kyndio, (+) control enfermo y (-) Control sano.

5. DISCUSIÓN

La caracterización del aislamiento del ToYMV seleccionado para este estudio, concuerda con lo reportado en Colombia en los departamentos de Cundinamarca y Tolima (Morales *et al*., 2002; Corrales *et al*., en prensa) y confirma la diseminación de este virus en el país en las plantaciones de tomate (Morales *et al.*, 2002). Esta diseminación ha sido asociada a la mejor capacidad de adaptación del biotipo B de *B. tabaci* a otras zonas agrícolas donde el biotipo original no se encontraba.

Para evaluar los genotipos por su resistencia al ToYMV se hicieron inoculaciones artificiales; se ha reportado que las inoculaciones naturales en campo llevan a una infección mucho más suave comparada a las inoculaciones artificiales probablemente debido a una infección tardía y no sincronizada (Pico *et al*., 1998). Dentro de las formas de inoculación mediada por mosca blanca, la inoculación en jaula individual se reporta como un buen método para diferenciar cultivares con niveles variables de resistencia y también permite una distribución más uniforme del vector, previniendo los mecanismos de no preferencia (Pico *et al*., 1998).

Al hacer la estandarización del método de inoculación en jaula individual, se encontró que el tratamiento adecuado para la evaluación era el de 10 moscas por planta. Con este

número de moscas se logró una buena expresión de síntomas y se obtuvo una incidencia del 80%. Esto concuerda con lo reportado en estudios de evaluación de fuentes de resistencia a begomovirus en tomate donde se han utilizado 10-20 moscas por planta (Zakay *et al*., 1991, Santana *et al*., 2001, Giordano *et al*., 2005). La menor incidencia de la enfermedad observada al aumentar el número de individuos de *B. tabaci* por planta, se debió a la interferencia y estrés causado a las moscas blancas al aumentar su población dentro de un espacio muy limitado, lo cual las induce a migrar.

Además de la evaluación de los síntomas para determinar la incidencia de la enfermedad, se ha reportado que el tiempo en el cual la acumulación del virus comienza y el nivel de acumulación que alcanza son indicadores fiables de resistencia (Pico *et al.*, 1999). En este estudio se encontró que el procedimiento de hibridación (*dot blot*) fue más efectivo que la técnica del PCR para detectar la presencia del begomovirus seleccionado en plantas sintomáticas o asintomáticas sistémicamente infectadas. La técnica del *dot blot* permitió detectar ADN viral en hojas jóvenes, desde los 14 DDI, incluso en plantas asintomáticas. Se ha reportado que la desventaja de la técnica de PCR es la dificultad de obtener purificaciones de ADN de alta calidad de plantas de campo y que la efectividad de la detección por PCR decrece en estados avanzados de infección, alrededor de los 30 DDI cuando las plantas exhiben síntomas severos y el nivel de contaminantes incrementa los resultados erráticos (Pico *et al*., 1999). Esto concuerda con lo obtenido en los ensayos realizados en este trabajo donde claramente la correlación entre el porcentaje de plantas

con síntomas y el porcentaje de plantas detectadas con el virus varió de un 71% a los 14 DDI a un 46% a los 28 DDI.

Los genotipos evaluados en este estudio incluyeron las líneas seleccionadas en la Florida (FLA) como fuentes de resistencia a begomovirus del Nuevo (*Tomato mottle virus*) y Viejo Mundo (*Tomato yellow leaf curld virus* = TYLCV), presentes en ese Estado; el control susceptible CLN2026D, y variedades comerciales utilizadas en Colombia, susceptibles al ToYMV.

Para las variedad Unapal Maravilla y el híbrido Kyndio se obtuvo una incidencia del 100% desde los 14 DDI. Sin embargo, la detección del ADN viral no se logró para la totalidad de las plantas afectadas. En el desarrollo de los síntomas se observaron diferencias entre las plantas en las que se detectó el virus y aquellas en las que no. Para las primeras, el índice de severidad estuvo más cerca de la calificación de 4 (síntomas severos distribuidos en la totalidad de la planta), mientras que en las otras plantas la severidad estaba en un rango de 2-3 donde los síntomas fueron conspicuos pero leves a moderados, observándose principalmente en las hojas más viejas y no siendo tan evidentes en las hojas más jóvenes. Esta respuesta diferencial podría sugerir que estas dos variedades poseen algún mecanismo de resistencia, como la habilidad de escapar la infección, lo cual se manifiesta en una baja incidencia de la enfermedad en presencia del patógeno y su vector.

En la evaluación de campo de estas dos variedades, la incidencia también alcanzó el 100% al igual que la detección del ADN viral por *dot blot*. El porcentaje de plantas en las que se detectó el virus fue mayor que el obtenido en invernadero quizás porque la acumulación del virus fue mucho mayor teniendo en cuenta la edad de las plantas. Sin embargo, el desarrollo de la enfermedad no fue limitante para la producción porque las poblaciones de mosca blanca transmisoras del virus no estuvieron presentes en las primeras fases del cultivo debido a las altas precipitaciones registradas en la zona de estudio. Además el bajo porcentaje de moscas blancas en las que se detectó el virus (35%) muestra que la presión de inóculo no fue alta.

Para el testigo susceptible, la línea CLN 2026D, el inóculo presente en condiciones de campo fue suficiente para que se desarrollaran los síntomas más severos entre los genotipos evaluados, incluso provocando una necrosis foliar generalizada finalizando en muerte de las plantas.

Para las líneas desarrolladas en Florida (FLA), en general, se observó que hubo infección y desarrollo de síntomas cuando se hizo la inoculación artificial pero la severidad máxima fue 1.0 (síntomas leves visibles solo después de una búsqueda cuidadosa). En las líneas FLA 496-11-6-1-0 y FLA 653-3-1-0 hubo detección del virus en las plantas que desarrollaron los síntomas solo a partir de los 21 DDI; y en la línea FLA 478-6-3-1-11, además de la baja incidencia, no se detectó el virus. Este comportamiento sugiere un mecanismo de resistencia, donde el virus puede o no multiplicarse en algún grado, pero la

dispersión del patógeno a través de la planta es restringido en relación al hospedero susceptible, y los síntomas de la enfermedad generalmente son muy localizados y no son evidentes (Kang *et al*., 2005). La línea FLA 456-4, en cambio, donde se detectó ADN viral en la totalidad de las plantas evaluadas a los 28 DDI, es un caso de resistencia a la enfermedad donde el virus puede moverse sistémicamente en su hospedero sin manifestar síntomas, al contrario de lo que sucede en el testigo susceptible (Kang *et al*., 2005).

En campo las líneas FLA también se comportaron como resistentes al hacer la evaluación por síntomas, pero, sin embargo, la respuesta de los genotipos a la infección fue en algunos casos diferente a lo observado en invernadero. Por ejemplo, en la línea FLA 456-4 no se detectó ADN viral en ninguna de las plantas, en cambio para la línea FLA 478-6-3-1-11 se detectó en un 50% de las plantas de campo, mientras en invernadero fue la única línea donde no hubo detección. Estas aparentes variaciones en el comportamiento de los genotipos pueden deberse a que la infección natural puede ocurrir en condiciones desfavorables para el virus y sus vector, induciendo al escape de la infección (Lapidot & Friedmann, 2002).

Las líneas FLA son líneas creadas buscando hacer introgresión de genes de resistencia al TYLCV, presentes en accesiones de especies silvestres de *Solanum* (*Lycopersicon*) spp.. La línea FLA 456-4 viene del cruce de LA 2779 (*S. chilense*) que posee el gen Ty-3, (parcialmente dominante para resistencia al TYLCV, y ligado a otro gen de resistencia, el Ty-1) (Ji & Scott, 2006 en Bian *et al*., 2007), y el híbrido comercial '*Tyking*', el cual

aparentemente posee otro tipo de resistencia al TYLCV y a begomovirus bipartitos presentes en Brasil (Giordano *et al*., 2005). Esta línea ya había sido reportada como resistente a begomovirus presentes en el Valle de Zapotitán, El Salvador (Pérez & Hanson, 2004). El origen de la resistencia para FLA 653-3-1-0 viene igualmente de la accesión LA 2779 de *L. chilense* y el híbrido '*Tyking*' y se ha reportado como fuente de resistencia a infecciones de TYLCV controlada por un alelo recesivo (*tgr-1*) que afecta el movimiento del virus. Para la línea FLA 478-6-3 la fuente de resistencia es la accesión LA1938 de *L. chilense* (Bian, *et al*., 2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran a todas las líneas FLA con algún grado de resistencia al ToYMV, confirmando lo encontrado en otros estudios donde algunos genotipos seleccionados por su resistencia al begomovirus monopartito TYLCV, también se comportan como resistentes a begomovirus bipartitos (Giordano *et al*., 1999 en Santana *et al.*, 2001; Pérez & Hanson, 2004; Mejia *et al*., 2001 en Lapidot & Friedmann, 2002). Estas observaciones sugieren que existen diferentes genes de resistencia a begomovirus, tanto monopartitos como bipartitos en la especies silvestres de tomate, como *S. chilense.*

De esta manera, cualquiera de las líneas FLA podría ser una fuente potencial de resistencia al ToYMV. Sin embargo, en un programa de mejoramiento, es necesario conocer los mecanismos de resistencia que están operando para aumentar la vida útil de las variedades mejoradas. Según Van Den Bosch y colaboradores (2006), quienes crearon un modelo epidemiológico del pato-sistema planta-virus-vector, combinado con un modelo para

determinar la dinámica del virus dentro de la planta, se pueden definir cuatro tipos de resistencia que pueden o no ejercer una presión evolutiva sobre el virus, disminuyendo así la durabilidad de la resistencia. Uno de ellos es la resistencia que reduce el título del virus (restringe la multiplicación), donde la acumulación del virus es muy baja y no se desarrollan síntomas. El segundo mecanismo es la resistencia a la expresión de síntomas a pesar de la existencia de un título alto del virus. Y los otros dos tipos implican la resistencia en el momento de la inoculación o de la adquisición del virus por el vector, donde además de los factores bioquímicos puede estar involucrada la arquitectura de la planta (ej. densidad de tricomas). La línea FLA 456-4 fue un claro ejemplo de la resistencia que disminuye los síntomas a pesar de la multiplicación irrestricta del virus a los 28 DDI. Este tipo de resistencia debe ser manejado con cuidado pues según el modelo planteado, este genotipo sería una buena fuente de inoculo en el campo.

Para las otras líneas (FLA 496-11-6-1-0, FLA 653-3-1-0 y FLA 478-6-3-1-11), el mecanismo de resistencia sería similar al descrito inicialmente, donde la multiplicación del virus se ve restringida, particularmente a partir de cierta edad de la planta o condiciones de inoculación o adquisición del virus, permitiendo el escape a la infección en algunos individuos, mientras en otros evita los efectos adversos del virus en la fisiología de la planta en sus etapas iniciales (las más susceptibles al daño). Piven y colaboradores (1995) evaluando accesiones de *L. chilense*, fuente de resistencia para las líneas FLA, sugiere que en algunos materiales la resistencia podría estar asociada a la evitación de la transmisión del virus por el insecto vector o la inhibición de la entrada inicial del virus dentro de la

planta. Este tipo de resistencia no genera una presión de selección en el virus para evolucionar hacia virus con tasas de multiplicación más altas por lo que sería más favorable en la iniciación de un programa de mejoramiento donde se busca entregar cultivares que pongan la mínima presión de selección en el virus para que evolucione en cepas más agresivas (Van Den Bosch, 2006). Sin embargo, la experiencia que se ha tenido con el fríjol común y el begomovirus causal del mosaico dorado amarillo del fríjol, demuestra que este tipo de resistencia varía según la dosis (incidencia) del virus, y que estos materiales gradualmente disminuyen su nivel de resistencia (Morales, 2001).

La caracterización agro-morfológica por su parte mostró que las líneas FLA se adaptaron bien a las condiciones de evaluación en campo y que en general, a excepción de la línea FLA 456-4, que produce frutos pequeños de color naranja, todas tienen un buen tamaño de fruto con características muy similares al formato que comercialmente se conoce como tomate milano, con rendimientos que oscilaron entre 1.5 y 2.0 Kg/planta.

Evaluando las características de resistencia y las condiciones agro-morfológicas de los genotipos evaluados se pueden seleccionar las líneas FLA 653-3-1-0, FLA 496-11-6-1-0 y FLA 478-6-3-1-11 como fuentes de resistencia al ToYMV detectado en el Valle del Cauca. La importancia que ha cobrado la distribución del ToYMV en Colombia crea la necesidad de constituir programas de mejoramiento en tomate para el desarrollo de variedades resistentes, base de cualquier proyecto de control de begomovirus (Morales, 2006). Así, la selección de fuentes de resistencia y la estandarización de las técnicas de inoculación y

detección del virus logradas en este estudio para el ToYMV dan la base para el inicio de un proyecto de mejoramiento para la variedad Unapal Maravilla que busca, reducir las pérdidas económicas provocadas por las enfermedades virales en los últimos años, tratando de no afectar la producción y calidad del cultivo.

6. CONCLUSIONES

- La caracterización molecular del ADN-A mostró al ToYMV como el begomovirus presente en el cultivo de tomate en el Valle del Cauca.
- La evaluación de la resistencia de las líneas se estandarizó utilizando el método de jaula individual con 10 moscas por planta y haciendo detección del ADN viral con la técnica *dot blot.*
- Las líneas FLA 496-11-6-1-0, FLA 478-6-3-1-11, FLA 456-4 y FLA 653-3-1-0 se comportaron como genotipos resistentes a la inoculación con el ToYMV.
- Las línea FLA 456-4 se comportó como una línea resistente solo a los síntomas permitiendo la acumulación del ADN viral y por tanto haciéndola no elegible para los procesos de mejoramiento genético de tomate.
- El comportamiento agronómico de las líneas FLA mostró, en general, buenas características de los frutos y del rendimiento que hace a estos genotipos aptos para un programa de mejoramiento, a excepción de la línea FLA 456-4 que mostró frutos pequeños y de color naranja.
- Las líneas FLA 496-11-6-1-0, FLA 478-6-3-1-11, y FLA 653-3-1-0, con el mejor comportamiento agronómico y nivel de resistencia al ToYMV, son los genotipos aptos para el inicio del programa de mejoramiento genético del tomate var. Unapal-Maravilla.

7. BIBLIOGRAFÍA

ASCENCIO-IBÁÑEZ, J.T., Díaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z.I., Arguello-Astorga, G.R. & Rivera-Bustamante, R.F. 1999. First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Dis.* 83(2):1178.

BIAN, X.-Y., Thomas, M.R., Rasheed, M.S., Saeed, M., Hanson, P., De Barro, P.J. & Resaian, M.A. 2007 A recessive allele (tgr-1) conditioning tomato resistnace to geminivirus infection es associated with impaired viral movement. *Phytopathology* 97: 930-937.

BROWN, J.K., Idris, A.M., Torres-Jerez, I., Banks, G.K. & Wyatt, D. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Arch. Virol.* 146:1581-1598.

CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL. 2006. Plan Hortícola Nacional [http://www.cci.org.co/publicaciones/1_PHNfinal.pdf] 08-2006

CORRALES, A.R., Martínez, A.K. & Morales, F.J. Caracterización molecular de los begomovirus que afectan la producción de tomate (Solanum lycopersicum) en Cundinamarca y Tolima, Colombia. En prensa.

DEBROT, E.A. & Centeno, F. 1985. Infección natural de la papa en Venezuela con el mosaico amarillo del tomate, un geminivirus transmitido por mosca blanca. *Agron. Trop.* 35: 125-138.

DE BARRO, P.J. & Driver, F. 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust. J. Entom.* 36: 149-152.

FAUQUET, C. M., Bisaro, D. M., Briddon, R.W., Brown, J. K., Harrison, B. D., Rybicki, E. P., Stenger, D. C. & Stanley, J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Arch Virol* 148: 405–421.

FREITAS-ASTUA, J., Purcifull D. E., Polston J. E. & Hiebert, E. 2002. Traditional and transgenic strategies for controlling tomato-infecting begomoviruses. *Fitopatol. Bras*. 27 (5): 437-449.

GILTBERSON, R. L., Rojas, M. R., Russel, L.D. & Maxwell, D. P. 1991 The use of the asymetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability among isolates of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. *J. Gen. Virol.* 72:2843-2848.

GIORDANO, L.B., Silva-Lobo, V.L.; Santana, F.M., Fonseca, M.E.N., Boiteux, L.S. 2005. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica* 143: 27–33

HERNANDEZ-VERDUGO, S., Guevara-Gonzalez R., Rivera-Bustamante R. & Oyama K. 2001. Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to pepper huasteco virus (PHV): Presence of viral DNA and differentiation among populations. *Euphytica* 122: 31–36.

IPGRI.1996. Descriptores para el tomate (*Lycopersicon* spp.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.

JONES, D. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European J. Plant Pathol.* 109: 195–219.

KANG, B-C., Yeam, I. & Jahn, M.M. 2005. Genetics of Plant Virus Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 581-621.

LAPIDOT, M. & Friedmann, M. 2002. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Ann. appl .Biol.* 140: 109-127.

LING, K.S., Simmons, A.M., Hassell, R.L., Keinath, A.P. & Polston, J.E. First Report of Tomato yellow leaf curl virus in South Carolina. *Plant Dis*. 90 (3): 379.

MORALES F.J. 2001. Conventional breeding for resistance to *Bemisia tabaci*-transmitted geminiviruses. *Crop Prot.* 20: 825-834.

MORALES, F.J. 2006. History and Current Distrubution of Begomovirus in Latin America. *Adv. Virus Res.* 67:127-162.

MORALES, F.J. & Anderson, P. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol* 146: 415–441

MORALES, F. J., Muñoz, C., Castaño, M. & Velasco, A.C. 2000. Geminivirus transmitidos por mosca blanca en Colombia. *Fitopatol. Colomb.* 24: 95-98.

MORALES, F.J., Martinez A. K. & Velasco A.C. 2002. Nuevos brotes de begomovirus en Colombia. *Fitopatol. Colomb.* 26: 75-79

MORALES, F.J., Lastra, R., de Uzcátegui, R.C. & Calvert, L. 2001. Potato yellow mosaic virus: a synonym of Tomato yellow mosaic virus. *Arch Virol*. 146: 2249–2253

MOMOL, M.T., Simone, G.W., Dankers, W., Sprenkel, R.K., Olson, S.M., Momol, E.A., Polston, J.E. & Hiebert, E. 1999. First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Tomato in South Georgia. *Plant Dis.* 83:487.

PÉREZ, J.E. & Hanson, P. 2004. Breeding for resistance to whitefly-transmitted begomoviruses. En: Integrated Pest and Disease Management In Major Agroecosystmes Project PE-1. Annual Report, 2004, CIAT.

PICÓ, B., Díez, J., Nuez, F. 1998. Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. *Euphytica* 101: 259-271.

PICÓ, B., Díez, M.J. & Nuez, F. 1999. Improved techniques for tomato yellow leaf curl virus in tomato breeding programs. Plant Dis. 83: 1006-1012.

PIVEN, N.M., de Uzcátegui, R.C. & Infante, H.D. 1995. Resistance to tomato yellow mosaic virus in species of *Lycopersicon*. *Plant Dis.* 79: 590-594.

POLSTON, J.E. & Anderson, P. K. 1997. The Emergente of Whitefly-Transmitted Geminiviruses in Tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* 81(12): 1358-1369.

POLSTON, J.E., Bois, D., Serra, C-A. & Concepcion, S. 1994. First report of a tomato yellow leaf curl-like geminivirus in the Western Hemisphere *Plant Dis*. 78 (8): 831.

RAMPERSAD, S. N., Umaharan, P. 2003. Identification of resistance to *Potato yellow mosaic virus*-Trinidad isolate (PYMV-TT) among *Lycopersicon* species. *Plant Dis.* 87:686-691.

ROJAS, M.R., Giltberson R.L., Rusell D. R. & Mawell D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 77: 340-347.

SANTANA, F.V., Ribeiro, S., Moita, A.W., Moreira Jr., D.J, Giordano, L.B. 2001. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica* 122: 45–51

SANTOS, C.D.G., Ávila, A.C. & Resende, R.O. 2003. Estudo da interação de um begomovirus isolado de tomaterio com a mosca branca. *Fitopatol. Bras.* 28: 664-673.

VALLEJO, F.A. 1999. Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

VAN DEN BOSCH, F., Akudibilah, G., Seal, S. & Jeger, M. 2006. Host resistance and the evolutionary response of plant viruses. *J. Appl. Ecol.* 43: 506-516.

VARMA, A. & Malathi, V.G. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Ann. appl. Biol,* 142:145-164.

VAN REGENMORTEL, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. & Wickner, R.B. 2000. Virus taxonomy: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, London, San Diego, USA.

ZAKAY, Y., Navot, N., Zeidan, M., Kedar, N., Rabinowitch, H., Czosnek, H. / Zamir, D. 1991. Screening Lycopersicon accesions for resistance to tomato yellow leaf curl virus: Presence of viral DNA and symptom development. *Plant Dis.* 75: 279-281.

ZAMBRANO, K., Carballo, O., Geraud, F., Chirinos, D., Fernández, C. & Marys, E. 2007. First Report of Tomato yellow leaf curl virus in Venezuela. *Plant Dis.* 91:768.

ZHOU, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim-Nape, W., Robinson, D. J. & Harrison, B.D. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J. Gen. Viro.* 78: 2101–2111

8. ANEXOS

Anexo A. Resultados de los Análisis de Varianza para los datos de severidad para tres fechas de evaluación.

Variable	Fcal	Pr > F
Severidad (14 DDI)	15.30	<.0001**
Severidad (21 DDI)	19.97	<.0001**
Severidad (28 DDI)	24.16	<.0001**

[1] Los asteriscos señalan que hay diferencias significativas entre tratamientos con un nivel de confiabilidad del 95%.

Anexo B. Resultados de la Prueba de Duncan para la variable severidad.

Severidad a los 14 DDI

Grupo Duncan	Media	Tratamiento
A	2.9000	Unapal-maravilla
A		
A	2.8000	Kyndio
B	1.3000	CLN 2026D
B		
C B	1.0000	FLA 456-4
C B		
C B	1.0000	FLA 496-11-6-1-0
C		
C	0.2222	FLA 478-6-3-1-11
C		
C	0.2000	FLA 653-3-1-0

Severidad a los 21 DDI

Grupo Duncan	Media	Tratamiento
A	3.1000	Unapal-maravilla
A		
A	3.0000	Kyndio
B	1.7000	CLN 2026D
C	0.8333	FLA 496-11-6-1-0
C		
C	0.8000	FLA 456-4
C		
C	0.4000	FLA 653-3-1-0
C		
C	0.3333	FLA 478-6-3-1-11

Severidad a los 28 DDI

Grupo Duncan	Media	Tratamiento
A	3.5000	Kyndio
A		
A	3.4000	Unapal-Maravilla
B	2.5000	CLN 2026D
C	1.0000	FLA 653-3-1-0
C		
C	1.0000	FLA 496-11-6-1-0
C		
C	0.7000	FLA 456-4
C		
C	0.3333	FLA 478-6-3-1-11

Anexo C. Resultados de los Análisis de Varianza para las características del fruto.

Variable	Fcal	Pr > F[1]
Ancho fruto	39.21	<.0001**
Longitud fruto	35.77	<.0001**
Peso fruto	25.58	<.0001**
Rendimiento	3.3	0.0055*
Flores x inflorescencia	9.24	<.0001**

[1] Los asteriscos señalan que hay diferencias significativas entre tratamientos con un nivel de confiabilidad del 95%.