



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

POSTGRADO EN AGRONOMÍA



Comportamiento de cuatro cultivares de tomate ante el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y el *Tomato Venezuela virus* (ToVEV) transmitidos mediante *Bemisia tabaci*.

LISETH BASTIDAS

Maracay, octubre 2014



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

POSTGRADO EN AGRONOMÍA



Comportamiento de cuatro cultivares de tomate ante el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y el *Tomato Venezuela virus* (ToVEV) transmitidos mediante *Bemisia tabaci*.

LISETH BASTIDAS

FRANCIS GERAUD-POUEY

Maracay, octubre 2014

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de **Magíster**
Scientiarum en Agronomía, orientación Protección Vegetal.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Geraud-Pouey', written over a horizontal line.

PhD. Francis Geraud-Pouey

Tutor



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
POSTGRADO EN AGRONOMÍA
VEREDICTO



Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo de Grado** presentado por: **LISETH DEL CARMEN BASTIDAS, C.I. 14.370.469**, bajo el título "**COMPORTAMIENTO DE CUATRO CULTIVARES DE TOMATE ANTE EL *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) Y EL *Tomato Venezuela virus* (ToVEV) TRANSMITIDOS MEDIANTE *Bemisia tabaci***", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Magister Scientiarum en Agronomía**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 24 de octubre de 2014 a las 10:00 am., para que la autora lo defendiera en forma pública, lo que ésta hizo en el Salón "D" del Doctorado en Ciencias Agrícolas, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por la autora, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado representa un valioso aporte al entendimiento del problema de los begomovirus y *Bemisia tabaci* (Gennadius) en el cultivo del tomate, en lo metodológico para la orientación de futuras líneas de investigación en la búsqueda del manejo racional de estos problemas.



[Handwritten signatures]

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 24 días del mes de octubre del año 2014, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinador del jurado el PhD. Francis Geraud.



Dr. MAURO ALBARRACÍN
C.I. 2.813.339
AGRONOMÍA-UCV



MSc. EZEQUIEL RANGEL
C.I. 7.218.420
INIA-CENIAP



PhD. FRANCIS GERAUD P.
C.I. 5.421.831
AGRONOMÍA-LUZ
Tutor

FR/zp
24/10/14

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación del Ministerio para el Poder Popular de Ciencia y Tecnología por haber financiado parcialmente este trabajo a través del Proyecto N° G-2000001610 con la participación del Laboratorio de Manejo Integrado de Plagas en Frutales y Hortalizas (MIP-FH), de la Unidad Técnica Fitosanitaria, Facultad de Agronomía, La Universidad del Zulia, del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Simón Bolívar y del Centro de Biotecnología del Instituto de Estudios Avanzados.

A Dorys Chirinos y Francis Geraud, amigos y profesores de relevancia en mi formación académica, quienes han dado un valioso aporte a la realización de este trabajo. A los dos, muchas gracias por su apoyo incondicional y estímulo.

A todos a los que de una u otra manera han incidido para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis tíos-padres: Giovanni y Mireya Bastidas, les dedico esta meta alcanzada, por todos sus esfuerzos y sacrificios para sacarnos adelante.

A mis hermanos: Lisbeth, Alex, Yarniuska, Samuel y Yogenis.

Y especialmente a Adeldo Carvajal y Adrián Carvajal Bastidas, mis dos amores.

INDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE DE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
 CAPÍTULO I	
TRANSMISIÓN DE ToVEV Y TYLCV A DIFERENTES CULTIVARES MEDIANTE <i>Bemisia tabaci</i>	
Introducción.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Ubicación del estudio.....	12
Cultivares evaluados.....	12
Begomovirus evaluados.....	13
Colonia de <i>Bemisia tabaci</i> libre de virus	14
Plantas fuentes con TYLCV y ToVEV	14
Siembra y mantenimiento de plantas para los ensayos.....	18
Aparición de síntomas y eficiencia de transmisión.....	19
Asilamiento de ADN.....	22
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
Separación electroforética de fragmentos de ADN en gel de agarosa	24
Secuenciamiento de los productos positivos	25
Diseño experimental y análisis de datos.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
Detección de begomovirus mediante PCR en muestras de plantas fuentes, algodón y hembras adultas de <i>B. tabaci</i> usadas en los ensayos de transmisión	26
Identidad del Begomovirus	28

Ensayos de transmisión: porcentaje de plantas sintomáticas y velocidad en manifestación de síntomas	29
Caracterización de síntomas de TYLCV y ToVEV en los cultivares	35

CAPÍTULO II

EFFECTO DE LOS BEGOMOVIRUS TYLCV Y ToVEV SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS BIOMÉTRICOS EN CUATRO CULTIVARES DE TOMATE

Introducción.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Medición de parámetros biométricos	42
Diseño experimental y análisis de datos.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Altura de la planta	45
Área Foliar	47
Número de hojas.....	50
Frutos: número, peso fresco y peso seco	52
Pesos secos totales (Hojas + tallos)	57
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
LITERATURA CITADA.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO Nº		Pág.
1	Promedio general del porcentaje de plantas con síntomas de TYLCV y ToVEV transmitidos mediante <i>Bemisia tabaci</i> en los diferentes cultivares de tomate evaluados	30
2	Promedio general del día de aparición de síntomas de TYLCV y ToVEV transmitidos mediante <i>Bemisia tabaci</i> en los diferentes cultivares de tomate evaluados	32
3	Efecto de los <i>begomovirus</i> TYLCV y ToVEV en la altura (Alt) en los diferentes cultivares de tomate, transmitidos mediante <i>Bemisia tabaco</i>	46
4	Efecto de los <i>begomovirus</i> TYLCV y ToVEV en el área foliar (AF) en los diferentes cultivares de tomate, transmitidos mediante <i>Bemisia tabaco</i>	49
5	Efecto de los <i>begomovirus</i> TYLCV y ToVEV en el número de hojas (NH) en los diferentes cultivares de tomate, transmitidos mediante <i>Bemisia tabaci</i>	51
6	Efecto de los <i>begomovirus</i> TYLCV y ToVEV en los frutos en: número (Nº), peso fresco (PF) y peso seco (PS) en los diferentes cultivares de tomate, transmitidos mediante <i>Bemisia tabaci</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA Nº		Pág.
1	Colonia de <i>Bemisia tabaci</i> libre de virus mantenidas en plantas de algodón, en jaulas dentro del laboratorio	15
2	Plantas de los cultivares de tomate, confinadas en jaulas cilíndricas	20
3	Succionador de boca para la colecta de <i>Bemisia tabaci</i>	20
4	Detección de ADN viral mediante PCR con iniciadores AV494-AC1048, en las plantas de tomate fuentes de los virus y plantas de algodón de la colonia de moscas sanas. M: Marcador molecular, C-: Control negativo de tomate. C+: Control positivo de tomate, 1: Planta fuente de TYLCV, 2: Planta fuente de ToVEV, 3: Planta de algodón. La flecha indica el fragmento de 550 pb	27
5	Detección de ADN viral mediante PCR en los adultos de <i>Bemisia tabaci</i> usados en los experimentos. M: Marcador molecular., C-: Control negativo. C+: Control positivo, 1: Adultos de <i>B. tabaci</i> alimentados sobre plantas con TYLCV: 2. Adultos de <i>B. tabaci</i> alimentados sobre plantas con TOVEV. 3 Adultos de <i>B. tabaci</i> alimentados sobre plantas de algodón. La flecha indica el fragmento de 550 pb	28
6	Detalles de síntomas en las plantas de los cuatro cultivares de tomate, <i>Solanum lycopersicum</i> L. (columnas), infectadas por virus (TYLCV y ToVEV) mediante <i>Bemisia tabaci</i> y no infectadas (filas). Letras refieren diferencias sintomáticas.....	31
7	Porcentajes de síntomas de TYLCV y ToVEV acumulados en el tiempo para los diferentes cultivares de tomate después de expuesto a adultos virulíferos de <i>Bemisia tabaci</i>	34
8	Detección de ADN viral mediante PCR en plantas de tomate sometidas a los diferentes tratamientos. M: Marcador molecular., C-: Control negativo. C+: Control positivo, VRG: variedad Río Grande. La flecha indica el fragmento de 550 pb	35
9	Clorosis de las nervaduras en el cultivar Alba causado por el virus ToVEV.....	36
10	Cultivares de tomate expuestos a los diferentes tratamientos en las jaulas umbráculos	45

11	Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en la altura de plantas en diferentes cultivares de tomate. Muestreos: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.....	47
12	Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en el área foliar total en los diferentes cultivares de tomate. Muestreos: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.....	50
13	Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en el número de hojas en los diferentes cultivares de tomate. Muestreos: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.....	52
14	Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en el peso fresco de frutos en los diferentes cultivares de tomate. Muestreos: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.....	55
15	Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en el peso seco de frutos en los diferentes cultivares de tomate. Muestreos: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.....	56
16	Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en el peso seco total en los diferentes cultivares de tomate. Muestreos: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.....	59

Comportamiento de cuatro cultivares de tomate ante el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y el *Tomato Venezuela virus* (ToVEV) transmitidos mediante *Bemisia tabaci*.

Por: Liseth Bastidas

RESUMEN

El complejo begomovirus-*Bemisia tabaci* (Gennadius), constituye el principal problema fitosanitario en el cultivo de Tomate en Venezuela, así como en el resto de la faja tropical y subtropical del planeta. El uso de genotipos resistentes a begomovirus, es una valiosa alternativa en el Manejo Integrado de este problema. En consecuencia, se evaluó el comportamiento de cuatro cultivares de tomate (Río Grande, Alba, El Cid y Shan TY; el primero susceptible y los otros tres promocionados como resistentes a TYLCV), ante dos de los begomovirus más comunes en el país: TYLCV y ToVEV, transmitidos mediante *B. tabaci*, a plantas creciendo en macetas. Se realizaron dos experimentos: 1.- Eficiencia de transmisión y tiempo para aparición de síntomas, en plantas mantenidas en jaulas umbráculos y 2.- Medición de algunos parámetros biométricos (altura de planta, área foliar, número de hojas, número y peso de frutos, así como peso seco vegetativo, en plantas a cielo abierto. En el experimento 1, con TYLCV, Río Grande mostró síntomas a los $12,6 \pm 1,2$ días pos período de acceso para inoculación (PAI) alcanzando el 100% de las plantas, mientras que en Alba, El Cid y Shan TY el tiempo de aparición varió de $14,1 \pm$ a $16 \pm$ días con 18,5-33,3 % de las plantas sintomáticas, en general leves. Con ToVEV, en Río Grande la aparición de los síntomas ocurrió a los $12,4 \pm 1,2$ días con 100% de plantas sintomáticas, para el resto de los cultivares más de la mitad de las plantas (amplitud; 66,7- 81,5 %,) mostraron síntomas entre $12 \pm 1,1$ a $14,9 \pm 1,4$ días pos PAI. El Cid mostró los síntomas más severos. En todos los cultivares expuestos a ambos begomovirus fue detectado ADN viral mediante PCR. Con el experimento 2, el efecto de TYLCV solo afectó el desarrollo en Río Grande. Con ToVEV, El Cid seguido de Río Grande fueron los más afectados, especialmente en altura de planta y área foliar. La resistencia a un begomovirus puede inferir cierto grado de resistencia a otros, pero no a todos.

Palabras claves: *Begomovirus*, cultivares resistentes, *Bemisia tabaci*.

Correo e: lisethbastidas@gmail.com

Behavior of four cultivars of tomato to the Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and the Tomato Venezuela (ToVEV) viruses transmitted by Bemisia tabaci.

For: Liseth Bastidas

ABSTRACT

The begomovirus-*Bemisia tabaci* (Gennadius) complex is the main fitosanitary problem in Venezuela as well as in the rest of the tropical and subtropical zone of the world. Genotypes resistant to begomoviruses, are a valuable alternative for integrated management of this problem. Consequently four tomato cultivars (Río Grande, Alba, El Cid y Shan TY; the first susceptible and the other three promoted as resistant to TYLCV), were assessed in potted plants for two of the most common begomoviruses in Venezuela, TYLCV and ToVEV, transmitted by *B. tabaci*. Two experiments were conducted: 1.- Transmission efficiency and time for symptoms appearance under shade cages and 2.- Measurement of biometric parameters (plant height, leaf number and area, fruit number and weight, as well as vegetative dry weight) in plants growing in the open. In the first experiment, Río Grande showed TYLCV symptoms after $12,6 \pm 1,2$ pos inoculation access period (IAP) reaching 100% of the plants while for Alba, El Cid and Shan TY it ranged from $14,1 \pm 1,3$ to $16 \pm 1,5$ days with 18,5-33,3 % mild symptomatic plants. With ToVEV, symptoms appeared $12,4 \pm 1,2$ days also with con 100% of symptomatic plants, for the remaining cultivars, more than half of the plants (amplitude: 66,7- 81,5 %,) showed symptoms between $12 \pm 1,1$ and $14,9 \pm 1,4$ days IAP. El Cid showed the most severe symptoms followed by Río Grande. In all the plants exposed to both begomoviruses viral DNA was detected by PCR. In experiment 2 TYLCV only negatively affected Río Grande. With ToVEV, El Cid followed by Río Grande were the most affected specially plant height and leaf area. Plant resistance to a begomovirus may infer some resistance to other begomoviruses, but not to all of them.

Key word: *Begomovirus*, resistant cultivars, *Bemisia tabaci*.

E mail: lisethbastidas@gmail.com

INTRODUCCIÓN GENERAL

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más consumidas en todo el mundo. Aunque es originario de Suramérica (Rick, 1976), en la actualidad forma parte de las dietas y platos tradicionales de gran cantidad de culturas. Igual de cosmopolita es su producción, siendo China el primer productor mundial, con un promedio de 50 millones de toneladas por año, seguido por la India y EE.UU. (FAO, 2014). En Venezuela, para el año 2012, la producción de tomate fue de 205.000 ton, en una superficie cosechada aproximada de 9.000 ha, para abastecer el mercado nacional de tomate fresco y para la industria, lo que lo ubica como uno de los principales cultivos hortícolas del país (FAO, 2014).

Durante muchos años la producción de este cultivo ha sido limitada por problemas fitosanitarios, entre éstos, los artrópodos plagas (Geraud-Pouey *et al.*, 1995) y las enfermedades virales (Debrot *et al.*, 1963; Lastra y Uzcátegui 1975; Nava *et al.*, 1996; 2006; Faria y Nava, 2009; Chirinos y Geraud- Pouey, 2011, Chirinos, *et al.*, 2011). La mosca blanca del tabaco, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), es el insecto de mayor relevancia en éste y otros cultivos hortícolas (Chirinos y Geraud- Pouey, 2011), puesto que además de los daños directos que causa a la planta como insecto chupador, tiene la capacidad de transmitir virus (Jones, 2003), entre los cuales resaltan los *Begomovirus* (Familia Geminiviridae), transmitidos de manera circulativa, no propagativa, exclusivamente por este vector (Hull, 2004; Fereres y Moreno,

2009), el cual ha adquirido gran relevancia debido a su impacto económico a nivel mundial (Polston y Anderson, 1997; Moriones y Navas-Castillo, 2000; Massumi *et al.*, 2009).

La mosca blanca, *B. tabaci*, es una especie polífaga ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Polston y Anderson, 1999), donde se alimenta de más de 600 especies de plantas cultivadas y silvestres, principalmente herbáceas, en más de 70 familias botánicas (Greathead, 1986).

El daño directo por *B. tabaci* es causado cuando inserta su estilete bucal en la hoja para alimentarse, chupando del floema los fotosintetizados, lo cual dependiendo de la infestación, puede debilitar a la planta, además causa una maduración desuniforme de los frutos (McKenzie y Albano 2009; McKenzie y Bauscher 2005), al afectar la biosíntesis del etileno en los mismos (Mcollum *et al.*, 2004), probablemente por efecto de enzimas salivales. Mientras que los daños indirectos se deben al crecimiento de hongos saprofitos en el melado producto de sus excreciones, limita la capacidad fotosintética de la planta y desmejora la apariencia de los frutos (Polston y Anderson, 1999; Fereres y Moreno, 2009). No obstante la mayor importancia de *B. tabaci* radica en su gran capacidad de transmitir virus, especialmente *Begomovirus*, un género exclusivamente transmitido por este insecto (Jones, 2003; Hull, 2004; Fereres y Moreno 2009), a una apreciable diversidad de plantas dicotiledóneas

herbáceas, cultivadas y silvestres, facilitado por su alta capacidad reproductiva y habilidad de colonización (Polston y Anderson, 1999).

Por su diversidad genética, dentro del ámbito biogeográfico que ocupa, *B. tabaci* era considerada como una “especie compleja” con al menos 20 biotipos (Chu *et al.*, 2008). El biotipo B presenta una amplia gama de hospedantes, es más prolífico y posiblemente tiene mayor capacidad de dispersión (Brown *et al.*, 1995). Esta capacidad reproductiva y habilidad de colonización, han contribuido a aumentar la capacidad de este biotipo, como vector de *Begomovirus* en tomate (Polston y Anderson, 1999), entre otras especies vegetales.

Recientemente se ha considerado a *B. tabaci* como un complejo de al menos 24 especies morfológicamente indistinguibles, cuyas nomenclaturas han sido designadas según el origen geográfico de cada una, añadido al nombre de la especie *B. tabaci*, las siglas del lugar geográfico, el cual si a la vez esta subdivido en zonas se le coloca un número. De este, modo el anteriormente llamado biotipo B ahora es “Middle East Asia Minor 1” (*B. tabaci* MEAN 1), el biotipo Q como “Mediterranean” (*B. tabaci* MED) y “New World” (*B. tabaci* NW)” para el complejo de especies de *B. tabaci* “indígenas” del continente Americano (De Barro *et al.*, 2011). En Venezuela el MEAN 1 predomina sobre el complejo de especies de *B. tabaci* del nuevo mundo (NW) (Romay *et al.*, 2011).

Geminiviridae es una de las dos familias de virus de plantas cuyos genomas consisten en cadenas sencillas de ADN (single stranded DNA; ssDNA) circular cubierta por una cápside icosaédrica geminada (Hull 2004; Fauquet *et al.*, 2005). En el caso de Geminiviridae, la capsida es geminada o gemela de aproximadamente de 18 nm de diámetro y 2,5 a 3 kb de peso molecular. Los geminivirus son clasificados en bipartitos o monopartitos, según su genoma. Los bipartitos están conformados por dos componentes, designados como A y B y cada componente tiene ~2.600 nt. Los genes del componente A están involucrados en la encapsidación y en la replicación, mientras que los genes del componente B están involucrados en el movimiento de los virus a través de la planta, en la determinación del rango de hospederos y en la expresión de síntomas (Hull, 2004). El componente A codifica cinco regiones, una en el sentido de virion siguiendo las agujas del reloj, llamada proteína de la cápside (CP) (antes V1) y cuatro en sentido complementario, que están involucradas en la replicación y la expresión: la proteína asociada con la replicación (Rep) (antes C1), la proteína activadora de la transcripción (TrAP) (antes C2), la proteína que incrementa la replicación (REn) (antes C3) y la proteína C4 cuya función es desconocida en bipartitos (Stanley *et al.*, 2005). Los dos set (sentido del virion y complementarios) son separados por una región anteriormente señalada, llamada intergénica, la cual comienza con el codón de inicio de la Rep y termina con el codón de inicio de la CP, en el caso de begomovirus bipartitos y de la V2 en el caso de monopartitos. Esta región no codifica ninguna proteína y su secuencia varía según el tipo de begomovirus,

con excepción de la secuencia conservada TAATATTAC comprendida en la región desapareada de una estructura de horquilla de una longitud de ~30 nt y es como común para todos los geminivirus (Stanley *et al.*, 2005). La región intergénica en los bipartitos es llamada región común porque su secuencia es altamente conservada en ambos componentes (Stanley *et al.*, 2005). La CP es necesaria para la encapsidación de los viriones, la transmisión a través del vector, la estructura del virus y la especificidad del huésped. En begomovirus bipartitos, la CP no es necesaria para diseminación local o sistémica del virus, mientras que para los monopartitos la CP es esencial para la diseminación viral (Stanley *et al.*, 2005). Con relación al componente B (ADN B), las regiones codifican dos proteínas. Las proteínas nucleares Shuttling NSP (antes BV1), la cual se transcribe en el sentido de la banda viral que se encarga del movimiento dentro de la célula (citoplasma – núcleo y viceversa) y la proteína del movimiento (MP) (antes BC1) que se transcribe en el sentido de la banda complementaria, está involucrado en el traslado del genoma viral célula a célula vía plasmodesmo (Gafni y Epel, 2002). El gen MP pareciera ser un elemento de inducción de síntomas o un determinante de la patogenicidad de los begomovirus bipartitos; estudios con mutaciones sugieren que la región 3' del gen MP está asociada con el desarrollo de síntomas (Gafni y Epel, 2002).

Los begomovirus monopartitos tienen un solo componente más grande (unos 2800 nt) similar al ADN A de los bipartitos, en el cual además de la CP, con la misma función que en los anteriores, posee un V2, no presente en los

bipartitos, que se encarga del movimiento célula a célula, y en este componente se cumplen todas las funciones que están divididas en los dos componentes (A y B) en los bipartitos. Aunque, la función del C4 en los bipartitos es desconocida, en los monopartitos, éste está involucrado en la patogénesis y expresión de los síntomas (Stanley *et al.*, 2005).

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, acrónimo inglés), la familia comprende cuatro géneros, los cuales se diferencian por la organización de sus genomas y sus insectos vectores (Fauquet *et al.*, 2008). Ellos son: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*.

Los *Mastrevirus*: tienen genoma monopartito y son transmitidos por saltahojas (Hemiptera: Cicadellidae) a plantas monocotiledóneas, tal es el caso del virus del rayado del maíz (*Maize streak virus*, MSV).

Los *Curtovirus*: poseen genoma monopartito y son transmitidos por saltahojas a plantas dicotiledóneas, el virus del encrespado apical de la remolacha (*Beet curly top virus*, BCTV).

El *Topocuvirus*: fue denominado recientemente, su genoma es monopartito y la especie tipo y único integrante, el *Tomato pseudo-curly top virus*, es transmitido por *Micrutalis malleifera* (Hemiptera: Membracidae).

Los ***Begomovirus*** tienen genoma bipartito o monopartito y son transmitidos exclusivamente y de manera circulativa por *B. tabaci*.

Los virus dentro de este último género han sido los más estudiados, debido a que son los causantes de la mayoría de las epifitias en diversos cultivos de especies dicotiledóneas, cuya importancia e incidencia esta directamente asociada a la distribución y dinámica poblacional de su insecto vector, *B. tabaci* (Morales, 2006). El Neotrópico, (trópico americano) ha sido la región más afectada en términos del número total de *Begomovirus* (más de 30 especies), cultivos infectados, pérdidas de rendimiento y área devastada por estos patógenos; alrededor de 5 millones de ha para el año 2001 (Morales y Anderson, 2001). En Venezuela, un inventario de virus llevado por mas de 10 años, muestra la gran diversidad de *Begomovirus* distribuidos a lo largo del territorio (Geraud-Pouey *et al.*, 2009a), entre esos se encuentran el virus monopartito *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y el virus bipartito *Tomato Venezuela virus* (ToVEV). El primero originario del llamado “Viejo Mundo” y el segundo del “Nuevo Mundo”.

Las medidas de control para los *Begomovirus* se han basado en la reducción de las poblaciones de *B. tabaci* mediante el uso de insecticidas (Polston y Anderson, 1997; Chirinos y Geraud-Pouey, 2011; Chirinos *et al.*, 2011), protección de semilleros (Hilje *et al.*, 2001; Hilje y Stansly, 2008) y el uso de materiales genéticos resistentes (Moriones y Navas-Castillo, 2000). Sin embargo, a pesar que el tomate es una especie originaria de Suramérica, el mejoramiento genético se ha llevado a cabo en zonas de clima templado (Morales y Anderson, 2001) y con especial énfasis en generar resistencia hacia

el virus TYLCV (Lapidot *et al.*, 1997). Es por ello que en este trabajo se planteó evaluar el comportamiento de cuatro cultivares comerciales de tomate ante la infección con TYLCV y ToVEV transmitidos mediante *Bemisia tabaci*. El ToVEV es uno de los Begomovirus más comunes infectando tomate en Venezuela.

CAPITULO I

TRANSMISIÓN DE TOVEV Y TYLCV A DIFERENTES CULTIVARES MEDIANTE *Bemisia tabaci*.

Introducción

El primer virus reportado como transmitido por *Bemisia tabaci* en Venezuela fue el “mosaico amarillento del tomate” (Debrot *et al.*, 1963), el cual fue posteriormente denominado *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV), basados en una secuencia parcial del componente A (Morales *et al.*, 2001). Este virus adquirió gran importancia porque limitaba el desarrollo y producción del cultivo (Lastra y Uzcátegui, 1975). Aunque, originalmente fue descrito basado en su sintomatología sobre tomate (Debrot *et al.*, 1963), la secuencia completa de su genoma fue determinada en Inglaterra a partir de muestras de papa (*Solanum tuberosum* L.) infectadas con el virus, enviadas desde Venezuela, quedando reportado como *Potato yellow mosaic virus* (PYMV) (Roberts *et al.*, 1986; Coutts *et al.*, 1991). Esto generó una controversia taxonómica (Morales *et al.*, 2001; Morales 2006; Nava *et al.*, 2012) la cual sigue siendo discutida, ya que rara vez se le consigue infectando papa, mientras que es muy común en tomate (Chirinos *et al.*, 2009a; Geraud-Pouey *et al.*, 2009a; Romay *et al.*, 2010).

Desde principios de la década de 1990, las enfermedades virales transmitidas por *B. tabaci* comenzaron a adquirir mayor relevancia en el cultivo del tomate (Geraud-Pouey *et al.*, 1995; Chirinos *et al.*, 2009a; Faria y Nava 2009; Romay *et al.*, 2010). Desde entonces, nuevos *Begomovirus* han sido detectados para varias zonas del país, entre éstos, destacan los encontrados en los estados Aragua, Guárico y Monagas, uno de los cuales secuenciados parcialmente, fue incluido en el GeneBank bajo el número de accesión AF026464 con el nombre de “Venezuela tomato geminivirus” (Guzmán *et al.*, 1997). Mencionando ese número de accesión, este virus fue luego denominado como ToVEV por Arguello-Astorga y Ruiz-Medrano (2001), lo cual se supone significa Tomato Venezuela virus, con el fin de adaptarlo a las reglas de nomenclatura propuestas por Fauquet *et al.* (2000), las cuales no existían cuando fue reportado este virus por Guzmán *et al.* (1997).

Posteriormente, un nuevo *Begomovirus* bipartito, fue mencionado para la región andina del país (Nava *et al.*, 2006). Basado en la caracterización completa de los componentes A y B de su genoma, fue denominado *Tomato yellow margin leaf curl virus* (TYLMCV), refiriendo su distribución geográfica en Venezuela (Nava *et al.*, 2012). En el año 2007 fue reportado por primera vez para Venezuela y Sur América el virus del encrespado amarillo de la hoja del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*; TYLCV siglas en inglés), encontrado en sembradíos comerciales de este cultivo en varios estados del país (Zambrano *et al.*, 2007). Adicionalmente, dos nuevos *Begomovirus* bipartitos fueron

detectados, *Tomato chlorotic leaf distortion virus* (ToCLDV) en el Zulia (Zambrano *et al.*, 2011) y *Euphorbia mosaic Venezuela virus* en Aragua (Zambrano *et al.*, 2012).

Todo esto sugiere una apreciable diversidad de begomovirus existentes en Venezuela. En este orden de ideas, Morales (2006) señaló que en Latinoamérica se encuentra la mayor diversidad e incidencia de estas afecciones virales. De hecho, un inventario nacional conducido por más de diez años, muestra esa apreciable diversidad, tanto de especies descritas como no descritas, siendo el ToVEV y el TYLCV dos de los más relevantes (Geraud-Pouey *et al.*, 2009b, Güerere, 2013). Las enfermedades causadas por las variantes genéticas del TYLCV, todas incluidas en lo que se conoce como Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD), constituyen una de las afecciones virales más devastadoras en el cultivo del tomate, causando pérdidas significativas en muchas regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo (Polston y Anderson 1999; Accotto *et al.*, 2000).

En consecuencia, es necesario conocer entre otros aspectos, la transmisión y efecto sobre cultivares de tomate, para así orientar la racionalización de los manejos de estas importantes enfermedades virales, especialmente en cuanto a la selección de cultivares resistentes a *Begomovirus*. En consecuencia, el objetivo de esta parte del presente trabajo fue evaluar la transmisión mediante *Bemisia tabaci* del ToVEV y el TYLCV, para estimar la velocidad de aparición de síntomas, porcentajes de infección y

relaciones entre infección y aparición de síntomas, como indicadores de infecciones en genotipos de tomate, promovidos en el mercado como resistentes a “*Begomovirus*”, a manera de alternativa de manejo de estos problemas fitosanitarios.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del estudio

Los ensayos de transmisión fueron conducidos en el laboratorio de Manejo Integrado de Plagas en Frutales y Hortalizas (MIPFH), Unidad Técnica Fitosanitaria, Facultad de Agronomía, La Universidad del Zulia (LUZ), Maracaibo, estado Zulia, durante el período enero 2009 – mayo 2011, mientras que los análisis moleculares se realizaron en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar (USB), Sarteneja, municipio Baruta, estado Miranda. Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT), identificado como proyecto G-2000001610.

Cultivares evaluados:

Se evaluaron cuatro cultivares de tomate de los cuales los tres primeros son promocionados como resistentes al *Begomovirus* TYLCV:

1. Shan TY (código: 3371, Hazera Genetics Seed Ltd, Berurim, Israel) con crecimiento determinado y fruto de forma oval tipo “perita”, utilizados tanto para el consumo fresco como industrial. Además de

presentar resistencia al TYLCV también promovido como resistente a *Tomato Mosaic Virus* (ToMV; *Tospovirus*, Virgaviridae) y *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV; Bunyaviridae).

2. El Cid (Petoseed Co. Inc., Saticoy California, EE.UU) de crecimiento determinado y con frutos redondo ligeramente achatados, resistente a TYLCV.
3. Alba (Cultivar proveniente del Programa de mejoramiento genético del tomate del Instituto “Liliana Dimitrova”, Güira de Melena, Provincia de Artemisa, Cuba), con crecimiento determinado, fruto redondo, resistente a TYLCV.
4. Río Grande (Petoseed Co. Inc., idem), crecimiento indeterminado, frutos ovales. Incluido como control por su susceptibilidad a ambos virus, TYLCV y ToVEV.

Begomovirus evaluados:

TYLCV, con genoma monopartito introducido desde Medio Oriente y el ToVEV con genoma bipartito como uno de los virus autóctonos de Venezuela. Ambos provenientes de plantas fuentes mantenidas en ambientes separados en los laboratorios de MIPFH. Dichos begomovirus fueron previamente identificados tal como lo detallan Geraud-Pouey *et al.* (2009b) y Chirinos *et al.* (2012), respectivamente.

Colonia de *Bemisia tabaci* libre de virus.

La colonia de *B. tabaci*, libre de virus, previamente determinada como del biotipo B (Geraud-Pouey *et al.*, 2009b) ahora *B. tabaci* MEAM 1 (Romay *et al.*, 2011), fue mantenida sobre plantas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.), dentro de jaulas entomológicas de madera (0,53m x 0,53m x 0,53m, largo x ancho x alto) con manga de tela y parte posterior aireada a través de cobertura de organza (0,45m x 0,53m, largo x ancho) e iluminadas artificialmente combinando en un panel de 125 x 45 cm (largo x ancho) cuatro tubos fluorescentes de 40 W y cinco bulbos incandescentes de 60 W, con fotoperiodo de 12:12 horas luz: oscuridad, bajo el cual estaban colocadas las jaulas a unos 40 cm, sin excluir la luz natural (Figura 1). Para mantener la colonia, cada mes eran iniciadas dos nuevas jaulas con plantas (3-4/jaula) de 15 días de germinadas, exponiéndolas a adultos recién emergidos de otras jaulas, colectados con un succionador de boca. El algodón ha sido reportado como planta no huésped del TYLCV (Czosnek *et al.*, 1993). Además, periódicas exposiciones comprobatorias de plantas de tomate a estas moscas, nunca produjeron síntoma alguno.

Plantas fuentes con TYLCV y ToVEV.

El origen y mantenimiento de las plantas infestadas (fuentes) con TYLCV, fue referido por Geraud *et al.*, (2009b) y es resumido a continuación. Se trata de una colonia iniciada a partir de una planta colectada en el año 2004 proveniente de un sembradío de tomate en las márgenes del Río Limón, estado

Zulia. Las plantas son mantenidas en jaulas entomológicas, ya descritas. Para transmitir el agente causal de los síntomas de la planta colectada, 40 adultos de *B. tabaci* recién emergidos criados sobre plantas de algodón, fueron colocados



Figura 1. Colonia de *Bemisia tabaci* libre de virus mantenidas en plantas de algodón, en jaulas dentro del laboratorio.

por un periodo de 72 horas sobre ramas cortadas de la planta fuente. Posteriormente, cuatro plantas sanas (tomate) de un mes de germinadas, cultivadas en jaulas umbráculos, fueron expuestas a estos adultos (10/planta). Estas nuevas plantas fueron colocadas dentro del laboratorio en jaulas entomológicas ya descritas. Para mantener la colonia del virus, se procedió a coleccionar folíolos de plantas con síntomas, ninfas del cuarto estadio N4 (“pupas” ojos visibles a través del integumento), estas fueron despegadas y colocadas en capsulas Petri hasta la emergencia de los adultos. Los adultos recién

emergidos, fueron transferidos a nuevas plantas sanas de tomate para la transmisión del virus adquirido durante la fase de ninfa. Así se asegura en este caso, la transmisión exclusiva de *Begomovirus* a las plantas sanas, debido a que estos son transmitidos únicamente por *B. tabaci* de manera circulativa (Hull, 2004). El individuo es capaz de adquirir el virus en su fase de ninfa y posteriormente transmitirlo al transformarse en adulto sin necesitar alimentación adicional sobre plantas enfermas (Romay *et al.*, 2010).

En contraste, los crinivirus transmitidos por *B. tabaci* de manera semipersistente, requieren que el insecto adquiera el virus como adulto para ser transmitidos por regurgitación (Jones, 2003). Los virus no persistentes y los semipersistentes no penetran en el insecto más allá de los estiletes y del estomodeo, respectivamente (Hull, 2004). En consecuencia, con el proceso de muda, por ser ambos de origen embrionario ectodérmico (Snodgrass, 1935), están recubiertos por cutícula, la cual es cambiada, así todos estos tipos de virus no circulativos en esos órganos, son eliminados con la exuvia del insecto (Racchah, 2001).

La presencia de TYLCV en las plantas fuentes fue confirmada a partir de la secuencia del fragmento de 851 pb, con los cebadores específicos que abarcan la secuencia completa del gen de la cápside, mostró 96% de identidad nucleotídica con el aislado de TYLCV-Mild recientemente reportado en Venezuela por Zambrano *et al.* (2007) y 98% de identidad con los aislados TYLCV Mild-Portugal y TYLCV Mild –Spain. La secuencia realizada para

TYLCV de muestras obtenidas de las plantas fuentes de este virus mantenido en la UTF, LUZ, fue recientemente depositada en el banco de genes (GenBank, siglas en inglés), la cual quedó registrada con el No. de accesión JX025074 (Chirinos *et al.*, 2012).

En otro laboratorio y con las mismas condiciones de jaulas ya descritas para las plantas fuentes de TYLCV, igual fueron mantenidas las plantas fuentes de ToVEV, cuyo origen y mantenimiento de las plantas fuentes fue señalado por Chirinos *et al.* (2012) y también es resumido a continuación: Este begomovirus fue colectado de plantas muestreadas en la zona de Peribeca, estado Táchira, en julio de 2007, la colonia fue iniciada y mantenida de la misma forma como han sido mantenidas las plantas de la colonia de TYLCV.

Para confirmar la presencia del ToVEV, se siguió un procedimiento similar al del TYLCV, pero en este caso se amplificó un fragmento de 1300 pares de bases correspondientes a la región común y parte de los genes AV1 y AC1, utilizando los cebadores degenerados AV1978 y AC715 diseñados por Rojas *et al.*, 1993. La secuenciación de este fragmento mostró un 95% de identidad nucleotídica con el ToVEV descrito por Guzmán *et al.*, 1997. Esta secuencia también fue recientemente depositada en el banco de genes (Genebank, siglas en inglés) quedando referida con el número de accesión JX025075 (Chirinos *et al.*, 2012).

Siembra y mantenimiento de plantas para los ensayos

Las semillas de cada uno de los cultivares de tomate fueron sembradas en bandejas germinadoras de polietileno de 28 cm de ancho X 55 cm largo, con 128 receptáculos, sobre sustrato a base de turba de musgo (Sunshine Plug Mix #5, Sun Grow Horticulture Inc. Washinton, EEUU) y mantenidas en jaulas entomológicas dentro del laboratorio hasta el momento de la germinación.

Luego de la germinación, las bandejas fueron trasladadas hacia las jaulas tipo umbráculo (2,3 m largo x 1,12 m de ancho x 1m de alto; estructura de perfiles de aluminio cerrada con malla plástica anti-áfidos; cerradas con malla de nylon de 15 x 15 hilos.cm⁻²) al aire libre, colocadas sobre mesones en el exterior del laboratorio. Diariamente estas fueron regadas y fertirrigadas dos veces por semana a razón de 2 g.planta⁻¹ de la formula hidrosoluble 18-18-18.

Después de veinte días de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas a vasos plásticos desechables de 400 cc, cuyo sustrato consistió de una mezcla de suelo areno francoso y materia orgánica vegetal (“abono de rio”) en proporción 2:1, previamente esterilizada. Este proceso se realizó dentro del laboratorio, a fin de evitar riesgo de transmisión de cualquier enfermedad por insectos.

Aparición de síntomas y eficiencia de transmisión

Cada planta creciendo en vaso plástico, descrita anteriormente, fue confinada en una jaula cilíndrica de plástico transparente (sección de envase de gaseosa de 2 L, de 10 cm x 15 cm, (diámetro x altura) con el tope cerrado con organza) (Figura 2). Dentro de cada jaula, fue introducido un vial del succionador de boca con 20 adultos de *B. tabaci*, emergidos durante las últimas 24 h, provenientes de la colonia libre de virus (plantas de algodón), o de una de las colonias sobre plantas fuentes de TYLCV o ToVEV (Figura 3). Estas últimas fueron mantenidas durante 48 h como período de acceso para inoculación (PAI). Al culminar el PAI, las moscas fueron eliminadas de las plantas, asperjando una suspensión de imidacloprid (Relevo® 500) al 0,35 g. L⁻¹. Previo a la eliminación de los adultos con insecticida, se colectaron 20 moscas para cada una de las tres condiciones de transmisión (TYLCV, ToVEV y no virulíferas) por cada cultivar, reuniéndolas luego en muestras compuesta conformadas por 80 individuos por condición de transmisión, provenientes de los cuatro cultivares juntos, los cuales fueron preservados en alcohol etílico al 98% a -20°C. Esto se hizo para detectar la presencia de ADN viral en las mismas.



Figura 2. Plantas de los cultivares de tomate, confinadas en jaulas cilíndricas.

Luego, las plantas fueron individualmente trasplantadas a macetas plásticas de 3 L de capacidad y pasadas a las jaulas umbráculos en el exterior del laboratorio, para la evaluación de aparición de síntomas, mediante observaciones diarias, por un periodo de treinta (30) días post trasplante.

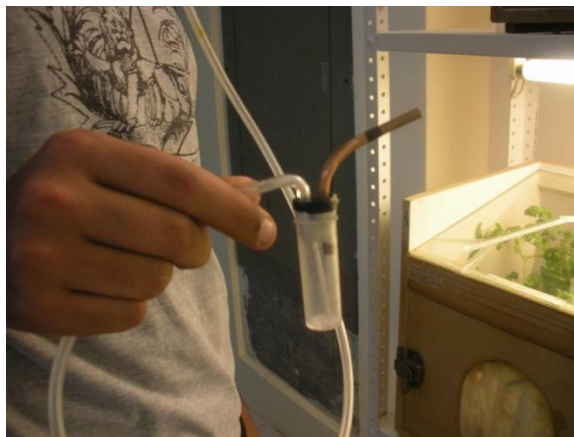


Figura 3. Succionador de boca para la colecta de *Bemisia tabaci*.

Los cultivares quedaron ordenados de acuerdo a los siguientes tratamientos: 1) Río Grande expuesto a moscas libre de virus, 2) Alba expuesto a moscas libre de virus, 3) El Cid expuesto a moscas libre de virus, 4) Shan TY expuesto a moscas libre de virus, 5) Río grande expuesto a moscas con TYLCV, 6) Río Grande expuesto a moscas con ToVEV, 7) Alba expuesto a moscas con TYLCV, 8) Alba expuesto a moscas con ToVEV, 9) El Cid expuesto a moscas con TYLCV, 10) El Cid expuesto a moscas con ToVEV, 11) Shan TY expuesto a moscas con TYLCV, 12) Shan TY expuesto a moscas con ToVEV.

Con el objeto de confirmar la presencia de virus en plantas expuestas a moscas blancas virulíferas y no virulíferas, se tomaron dos muestras de ápices foliares por tratamiento en cada repetición, en plantas sintomáticas y asintomáticas cuando las hubo. Esto se hizo como indicio de la resistencia de los cultivares evaluados. Asimismo, se tomaron muestras de ápices de las plantas fuentes de TYLCV y ToVEV, con las que se realizaron estos estudios, para cotejar la identidad del virus presente en éstas con la identidad del virus detectado en las plantas a las que se le realizó la transmisión. Igualmente se tomaron muestras de las plantas de algodón *G. hirsutum*, donde fueron mantenidas las moscas libre de virus.

Aislamiento de ADN

El ADN se extrajo de las muestras de ápices previamente mencionadas. Para ello se siguió el procedimiento de Gilbertson *et al.*, 1991 con las modificaciones que se detallan a continuación:

- 1) Se utilizó entre 0,5 mg y 1 mg de la muestra seca, la cual se maceró en un mortero con 500 μ l de buffer de extracción (50 mM EDTA, 500 mM de NaCl y 2 mM 2-mercaptoetanol).
- 2) El macerado obtenido se vertió en un micro tubo (Eppendorf de 1,5 ml), se le adicionó 33 μ l de 20% SDS (sodium dodecil sulfate – detergente) y se agitó en vortex.
- 3) Las muestras se colocaron en una incubadora (N-Brotec, NB-305 TB) por 10 min a 65 °C.
- 4) Luego a cada muestra se le agregó 160 μ l de una solución 5M de acetato de potasio pH 4,5 y se mezcló por inversión y se centrifugó en una micro centrifuga (Eppendorf mini-spin) a 10.000 x g durante 10 min.
- 5) Seguidamente se recolectó, muy cuidadosamente, 0,6 ml del sobrenadante y se vertió en un micro tubo limpio al cual se le adicionó 300 μ l de isopropanol y se mezcló cuidadosamente por inversión y luego se centrifugó por 10 min a 10.000 x g.

- 6) Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregó al precipitado 1 ml de etanol al 70% con el fin de lavarlo. Luego se volvió a centrifugar durante 5 min a 10.000 x g.
- 7) Seguidamente se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 5 a 10 min.
- 8) Finalmente se resuspendió el pellet (precipitado de ADN) en 250 µl de TE (10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA pH 8) y se conservó en frío.

Para la extracción de ADN viral de adultos de *B. tabaci*, preservadas en alcohol etílico absoluto, se tomaron 20 hembras tanto de los expuestos como no expuestos a virus, para ser procesadas por separado siguiendo el protocolo de Frohlich *et al.* (1999). Cada muestra fue colocada en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, con 60 µl de una solución tampón de lisis fría (5mM de Tris-HCl a pH 8; 0,5mM de EDTA; 0,5% v/v de Nonidet P40 y 0,1 mg/ml de Proteínasa K) y fueron trituradas utilizando una varilla fina de vidrio (micromortero). Posteriormente, la mezcla fue incubada a 65 °C por 15 minutos y seguidamente a 95 °C por 10 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 10.000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se colocó en un nuevo tubo de microcentrífuga para ser usado como fuente de ADN para la PCR.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la detección de ADN viral en las plantas y los adultos de *B. tabaci*, se amplificó un fragmento de unos 550 pb correspondiente a la región central

del gen que codifica la proteína de la cápside, utilizando los cebadores degenerados AV494 (5'-gcc yat rta yag raa gcc ma-3') y AC1048 (5'-ggr ttd gar gca tgh gta cat G-3'). La cantidad de ADN total usada en cada reacción fue de aproximadamente 1 µg, se usaron los cebadores AV494 y AC1048 de acuerdo a la metodología seguida por Wyatt y Brown (1996). Como control negativo se incluyeron plantas sanas de tomate creciendo en condiciones de aislamiento y como controles positivos plantas enfermas con TYLCV y ToVEV.

Las condiciones del termociclador para la amplificación fue de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 20 segundos y 72°C por 30 segundos. El producto de PCR fue analizado por electroforesis en agarosa al 1% y solución tampón de Tris-Acetato EDTA pH 8,0. En cada bolsillo se colocaron 8 µl del producto de PCR y 2 µl de tampón de carga, luego se corrió aproximadamente a 60 V por 30 min, al final de la corrida se tiñó el gel con bromuro de etidio (1 µg/ml) para la observación del fragmento amplificado a la luz ultravioleta.

Separación electroforética de fragmentos de ADN en gel de agarosa

Con el objeto de verificar la amplificación de fragmentos de ADN y la estimación de su tamaño se prepararon geles de agarosa (D-1 LE GQT x 100 g) al 1% en una solución TAE [Tris-base pH 8, ácido acético glacial y EDTA], al cual se le adicionó 5 µl de bromuro de etidio con el objeto de teñir los ácidos nucleicos. El gel fue colocado en una cámara de electroforesis que contenía TAE suficiente para cubrir dicho gel, el cual, posteriormente fue cargado con 4 µl de cada una de las muestras obtenidas por PCR, previamente mezcladas

con 1 µl de buffer de carga (una muestra por cada bolsillo). El gel también fue cargado con un blanco negativo y el marcador de fragmentos de ADN 1Kb plus de Invitrogen.

Luego la cámara fue conectada a una fuente de poder a 60 V por veinte minutos, con el fin de que el ADN (cargado negativamente) recorra el gel de agarosa. Una vez transcurrido este período, el gel fue colocado en un transiluminador (Bio-rad) con lámpara ultravioleta, con el objeto de fotografiar las bandas de ADN en el gel.

Secuenciamiento de los productos positivos

Los productos de PCR fueron secuenciados en el IDEA a través de electroforesis capilar en un analizador genético modelo ABI Prism™ 310 (Applied Biosystems, CA). Los fragmentos secuenciados fueron comparados por BLAST con las secuencias disponibles en el banco de genes GenBank. (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Diseño experimental y análisis de datos

El diseño fue un completamente al azar con arreglo factorial 3 x 4 (dos virus más el testigo sin virus y cuatro cultivares de tomate), para un total de doce (12) tratamientos, con tres (3) repeticiones, cuatro (4) cultivares y nueve (9) plantas evaluadas para cada tratamiento. Para un total de 324 plantas.

Para el porcentaje de plantas sintomáticas, los datos fueron transformados con la función $\sqrt{x+1}$ con el fin de homogenizar las varianzas y ajustarla a la distribución normal. En el caso de las variables día de aparición de síntomas y porcentaje de plantas sintomáticas, el análisis de la varianza fue hecho con el modelo lineal general (GLM) y las comparaciones de media con las pruebas de mínimos cuadrados ($P \leq 0,05$). Los análisis estadísticos fueron hechos con el programa estadístico SAS 6.0 1996 (Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de begomovirus mediante PCR en muestras de plantas fuentes, algodón y hembras adultas de *B. tabaci* usadas en los ensayos de transmisión.

La detección del virus por PCR utilizando la pareja de iniciadores AV494-AC1048 resultó positiva para las muestras de las plantas usadas como plantas de tomate fuentes tanto de TYLCV como de ToVEV, observándose el fragmento de tamaño esperado de 550 pb (Figura 4: 1 y 2), mientras que las muestras tomadas de plantas de algodón usadas como control negativo, en las cuales se mantuvo la colonia de moscas blancas no virulíferas, no mostraron dichas

bandas, lo que demuestra que no estaban infectadas con begomovirus (Figura 4: 3).

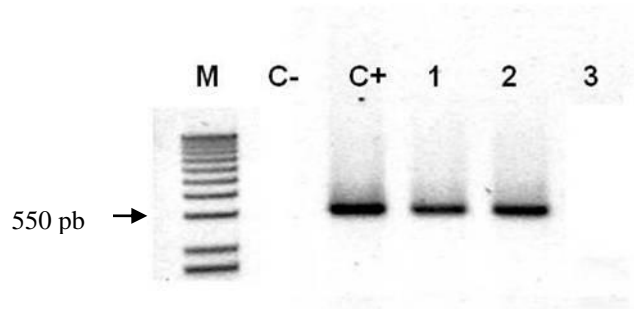


Figura 4. Detección de ADN viral mediante PCR con iniciadores AV494-AC1048, en las plantas de tomate fuentes de los virus y plantas de algodón de la colonia de moscas sanas. M: Marcador molecular, C-: Control negativo de tomate. C+: Control positivo de tomate, 1: Planta fuente de TYLCV, 2: Planta fuente de ToVEV, 3: Planta de algodón. La flecha indica el fragmento de 550 pb.

Por otro lado, la amplificación mediante PCR utilizando los mismos iniciadores previamente indicados, también permitió la detección de ADN viral en las moscas virulíferas que fueron utilizadas en los ensayos de transmisión tanto para TYLCV como para ToVEV, resultado que contrastó con lo observado para aquellas utilizadas como control negativo donde no se detectó ADN viral (Figura 5).

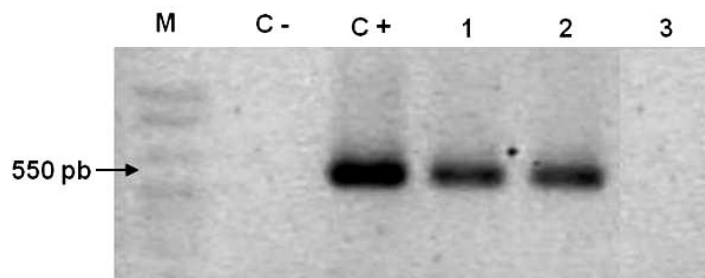


Figura 5. Detección de ADN viral mediante PCR en los adultos de *Bemisia tabaci* usados en los experimentos. M: Marcador molecular., C-: Control negativo. C+: Control positivo, 1: Adultos de *B. tabaci* alimentados sobre plantas con TYLCV: 2. Adultos de *B. tabaci* alimentados sobre plantas con TOVEV. 3 Adultos de *B. tabaci* alimentados sobre plantas de algodón. La flecha indica el fragmento de 550 pb.

Identidad del Begomovirus

Los productos de PCR obtenidos para las plantas fuentes de TYLCV, ToVEV y las respectivas moscas virulíferas utilizadas durante los ensayos de transmisión, purificados y secuenciados, al compararse con las secuencias disponibles en el banco de genes a través del Programa Blast, mostraron para TYLCV un 99% de identidad con la secuencia equivalente del aislado de TYLCV-Mild previamente descrito en Portugal (GenBank, número de accesión: AF105975) aislado descrito por primera vez en Venezuela (Zambrano *et al.*, 2007). En el caso de ToVEV, la secuencia nucleotídica arrojó una similitud del 94% con “Venezuela tomato geminivirus” AC1 AV1 (Guzman, 1997), que como se explicó anteriormente ha sido tentativamente denominado ToVEV (Argüello-Astorga y Ruiz-Medrano, 2001). Esto determina molecularmente que los

begomovirus existentes en las plantas fuentes, y en las moscas virulíferas utilizadas fueron los transmisores a las plantas experimentales.

Ensayos de transmisión: porcentaje de plantas sintomáticas y velocidad en manifestación de síntomas.

En todos los cultivares evaluados, se observaron plantas sintomáticas independientemente del virus al cual fueron expuestas, aunque con diferencias de porcentajes (Cuadro 1), tiempo de aparición de síntomas (Cuadro 2) e intensidad de los mismos, de acuerdo a la combinación de cultivar y virus (Figura 6). Así, aunque en aquellos seleccionados para resistencia a TYLCV hubo manifestación de síntomas al ser infectadas con el mismo virus, en Río Grande se detectaron síntomas en todas las plantas evaluadas (100%), mientras que en Alba, El Cid y Shan TY sólo fueron observados en parte de éstas (amplitud: 18,5-33,3 %) (Cuadro 1). Es importante destacar que los síntomas observados en estos últimos cultivares resultaron bastante leves (Figura 6, TYLCV).

En contraste, cuando los mismos cultivares de tomate fueron infectados con ToVEV, en aquellos mejorados para resistir a TYLCV, hubo una mayor proporción de plantas que manifestaron síntomas. Así en Alba, El Cid y Shan TY, aunque los porcentajes de plantas sintomáticas resultaron inferiores comparados con Río Grande, más de la mitad de las plantas mostraron síntomas (amplitud; 66,7- 81,5 %, $P < 0,05$). No obstante, esto aunado al hecho

que los síntomas de ToVEV se manifestaron con mucho más rapidez en Río Grande comparado con el resto de los cultivares evaluados, denota un cierto grado de resistencia de los mismos a este virus.

Cuadro 1. Promedio general del porcentaje de plantas con síntomas de TYLCV y ToVEV transmitidos mediante *Bemisia tabaci* en los diferentes cultivares de tomate evaluados.

Cultivar	Tratamiento	% Plantas sintomáticas	n	PCR
Río Grande	Sin virus	0 d	27	-
	TYLCV	100,0 a	19	+
	ToVEV	100,00 a	14	+
Alba	Sin virus	0 d	27	-
	TYLCV	33,3 ± 6,8 bc	27	+
	ToVEV	81,5 ± 16,6 b	27	+
El Cid	Sin virus	0 d	27	-
	TYLCV	18,5 ± 3,8 c	27	+
	ToVEV	70,4 ± 14,4 b	25	+
Shan TY	Sin virus	0 d	27	-
	TYLCV	26,4 ± 5,8 bc	25	+
	ToVEV	66,7 ± 13,6 b	27	+

Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con las pruebas de mínimos cuadrados ($P \leq 0,05$), letras iguales no difieren significativamente entre sí. n: número de plantas evaluadas.

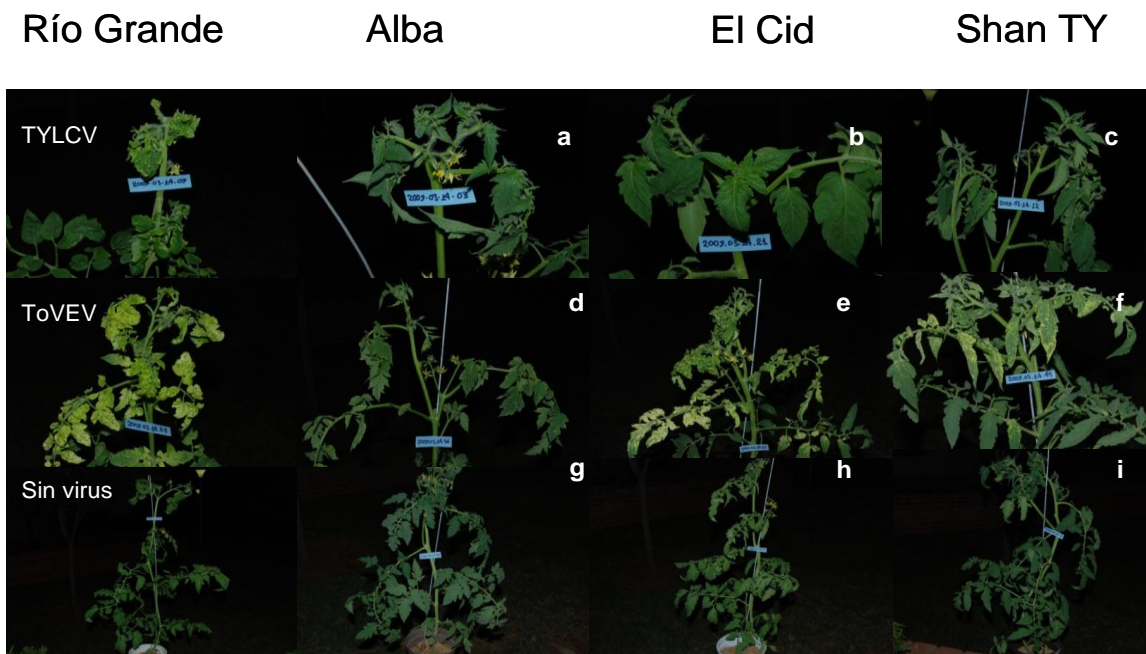


Figura 6. Detalles de síntomas en las plantas de los cuatro cultivares de tomate, *Solanum lycopersicum* L. (columnas), infectadas por virus (TYLCV y ToVEV) mediante *Bemisia tabaci* y no infectadas (filas). Letras refieren diferencias sintomáticas.

En la Figura 7 se muestra el porcentaje acumulado de síntomas en el tiempo (días) para ambos virus. En el caso de TYLCV (7a) las primeras plantas sintomáticas fueron detectadas en Río Grande a los 9 días después del PAI, mientras que en los otros cultivares esto ocurrió entre los 12 y 13 días, con menos del 20% de plantas sintomáticas, cuando el Río Grande ya había alcanzado el 70%, para llegar a la totalidad de las plantas sintomáticas (100%) a los 15 días posterior al PAI. Los tiempos promedio de aparición de síntomas son consistentes con estas diferencias ($P < 0,05$; Cuadro 2). Río Grande se infectó en el menor tiempo promedio (12 días), comparado con los otros cultivares, siendo Shan TY donde más se retardó la infección promedio (16 días; Cuadro 2) en las pocas plantas que los manifestaron (10%; Figura 7a).

Con variantes, similar fue la tendencia seguida por estos cultivares cuando fueron infectados con ToVEV (Figura 7b). Para Río Grande, cerca del 50% de las plantas estaban infectadas a los 10 días, comparado con los otros cultivares, donde aproximadamente la mitad de las plantas se infectaron a los 14 días, tiempo en el cual todas las plantas de Río Grande mostraron síntomas de la infección. El tiempo promedio de aparición de síntomas con este begomovirus no mostro mayor diferencias entre cultivares, con excepción de Río Grande, donde resultó inferior en comparación con Alba, en el cual resultó significativamente superior.

Cuadro 2. Promedio general del día de aparición de síntomas de TYLCV y ToVEV transmitidos mediante *Bemisia tabaci* en los diferentes cultivares de tomate evaluados.

Cultivar	Tratamiento	Días aparición de síntomas (días)	n
Río Grande	Sin virus	0	27
	TYLCV	12,6 ± 1,2 a	19
	ToVEV	12,4 ± 1,2 a	14
Alba	Sin virus	0	27
	TYLCV	14,1 ± 1,3 b	27
	ToVEV	14,9 ± 1,4 b	27
El Cid	Sin virus	0	27
	TYLCV	14,8 ± 1,4 b	27
	ToVEV	12,0 ± 1,1 a	25
Shan TY	Sin virus	0	27
	TYLCV	16,0 ± 1,5 c	25
	ToVEV	13,1 ± 1,2 ab	27

Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con las pruebas de mínimos cuadrados ($P \leq 0,05$), letras iguales no difieren significativamente entre sí. N: número de plantas evaluadas.

Aunque no todas las plantas de los cultivares resistentes mostraron síntomas de la enfermedad, bien sea TYLCV o ToVEV, en las muestras de plantas tomadas para éstas, tanto sintomáticas como asintomáticas, se detectó ADN viral cuando fueron analizadas a través de la PCR (Figura 8). Estos resultados confirman la presencia de ADN viral en las plantas que resultaron sintomáticas y convierte en hospederos asintomáticos a aquellos que aunque no manifestaron síntomas de la enfermedad, contenían begomovirus. Si bien esto denota resistencia a los begomovirus evaluados, plantea el riesgo de trasplantar al campo plantas asintomáticas portadoras de virus, potenciales fuentes para su transmisión mediante el insecto vector, especialmente si las condiciones de protección física para la propagación son inadecuadas como para evitar el acceso de insectos vectores a esos semilleros (Chirinos *et al.*, 2014).

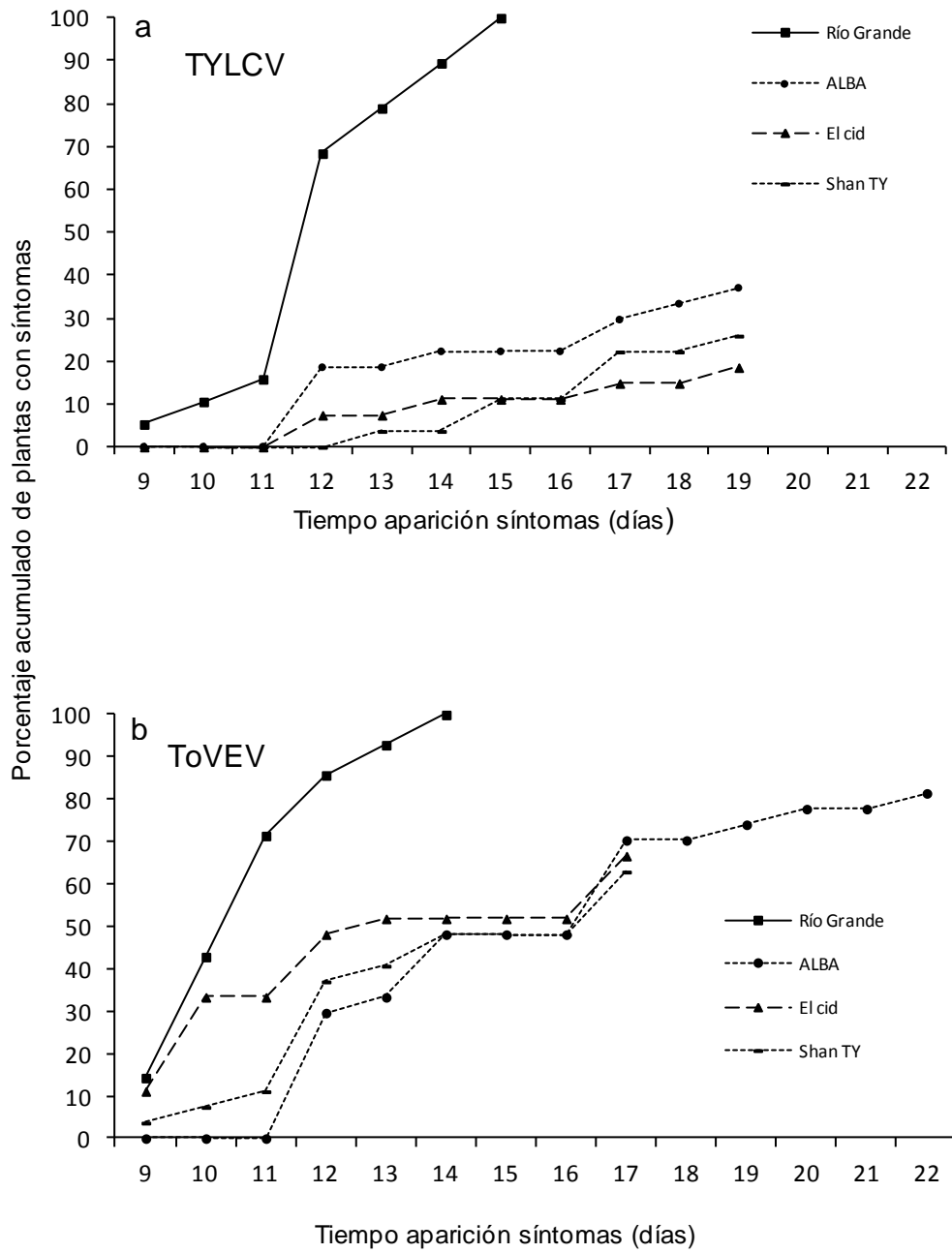


Figura 7. Porcentajes de síntomas de TYLCV y ToVEV acumulados en el tiempo para los diferentes cultivares de tomate después de expuesto a adultos virulíferos de *Bemisia tabaci*.

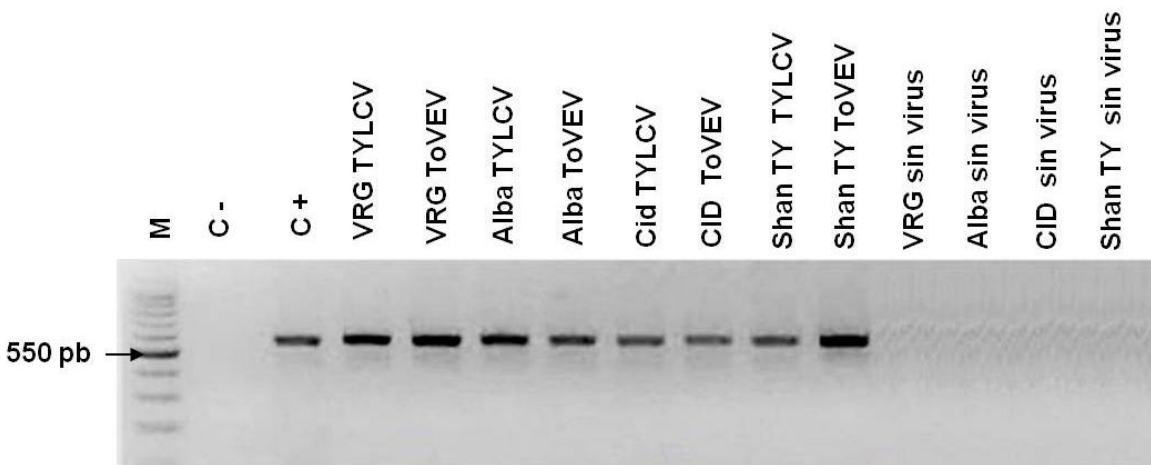


Figura 8. Detección de ADN viral mediante PCR en plantas de tomate sometidas a los diferentes tratamientos. M: Marcador molecular., C-: Control negativo. C+: Control positivo, VRG: variedad Río Grande. La flecha indica el fragmento de 550 pb.

Caracterización de síntomas de TYLCV y ToVEV en los cultivares

TYLCV. Los síntomas de este begomovirus en la variedad Río Grande se caracterizaron por achaparramiento de las plantas, encrespado de las hojas con clorosis y acortamiento de los entrenudos (Figura 6, TYLCV). Estos síntomas coinciden con los descritos para la misma variedad que fueron previamente detallados en otros ensayos de transmisión (Geraud *et al.*, 2009a; Chirinos *et al.*, 2012). No obstante, para el resto de los cultivares la sintomatología fue leve, con un muy ligero encrespado en las hojas comparado con las plantas inoculadas con moscas no virulifreas (Figura 6, TYLCV).

ToVEV. En Río Grande y Alba los síntomas se correspondían con mosaicos amarillentos iniciados desde nervaduras cloróticas, siendo éstos más severos en Río Grande (Figura 6, ToVEV). Sin embargo, a pesar que en este ensayo no se evaluó la severidad, en Alba predominó una clorosis en las nervaduras de las hojas, las cuales eran más intensas al inicio de la infección, desapareciendo paulatinamente hacia el final del período de la evaluación (Figura 9). En el caso de las plantas de El Cid, los síntomas fueron mucho más acentuados, mostrando deformación y moteados cloróticos en hojas, los cuales adquirieron una coloración amarillenta blanquecina. Estos síntomas fueron mucho más severos que en Río Grande (Figura 6, ToVEV), lo que sugiere la hipersensibilidad de este genotipo resistente al TYLCV, ante el bipartito ToVEV. En Shan TY, el ToVEV causó clorosis en venas con intensidad intermedia entre las descritas para los dos anteriores genotipos.



Figura 9. Clorosis de las nervaduras en el cultivar Alba causado por el virus ToVEV.

La mayor rapidez en la aparición de síntomas de ambos begomovirus en Río Grande, detectada durante este trabajo, coincide con lo previamente señalado por otros investigadores tanto para TYLCV (Chirinos *et al.*, 2009; Geraud-Pouey *et al.*, 2009b) como para ToVEV (Romay *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2011; Chirinos *et al.*, 2012). Así mismo, el bajo porcentaje de plantas sintomáticas, así como el retardo en la aparición de síntomas en Alba, El Cid y Shan TY ante TYLCV, era de esperar, debido a que estos son genotipos mejorados para resistir la infección por este begomovirus monopartito. Tal como se refirió previamente, la mayoría de los mejoramientos genéticos en tomate, se han dirigido a disminuir el impacto de TYLCV debido a las grandes pérdidas que ha causado en varias partes del mundo (Moriones y Nava-Castillo 2000; Gómez *et al.*, 2004).

El Alba merece especial atención dado que es un cultivar promocionado en Venezuela, como parte de la búsqueda de soluciones para disminuir los problemas fitosanitarios causados por begomovirus. Este cultivar manifestó síntomas leves de TYLCV en parte de las plantas evaluadas y ante la infección del ToVEV los síntomas fueron leves y tendieron a atenuarse hacia el final del ensayo, lo que sugiere silenciamiento génico, como producto de la degradación del ARN viral producido en el proceso de replicación del virus (Cortés y López 2011). Esto podría ser una medida de resistencia de un begomovirus mejorado para TYLCV ante un begomovirus autóctono como es el ToVEV. Sin embargo, otros estudios de laboratorio y campo deben ser realizados para promover su

uso en la disminución de los problemas causados por estas enfermedades virales.

El comportamiento de El Cid ante el TYLCV en cuanto su condición de hospedero asintomático concuerda con lo observado por Geraud-Pouey, *et al.* (2009b). Sin embargo, al ser expuesto al ToVEV presentó síntomas acentuados tal como fue anteriormente señalado y coincide con lo encontrado por Fernández *et al.* (2011). Aunque, en este trabajo los síntomas de ToVEV en El Cid se manifestaron más rápidamente (a los 12 días aproximadamente), comparado con lo observado (16 días) por los mismos investigadores.

El porcentaje de plantas sintomáticas y días de aparición de síntomas observados para el cultivar Shan TY, coincidió con lo obtenido por Chirinos *et al.* (2012) para los híbridos Helena y Cecile de la misma empresa productora de semillas, infectados con los mismos begomovirus evaluados en este trabajo. Estos híbridos resultaron asintomáticos ante el TYLCV, begomovirus para el cual fueron mejorados, pero mostraron síntomas en más de la mitad de las plantas evaluadas cuando fueron expuestos al ToVEV.

A pesar que la fuente de resistencia de begomovirus en tomate están dirigidas principalmente hacia el monopartito TYLCV, también se han realizado evaluaciones en el comportamiento en líneas de tomates resistentes a TYLCV ante el *Tomato chlorotic mottle* (begomovirus bipartito) obteniendo resultados promisorios (Giordano *et al.*, 2005). Así mismo, debido a la importancia del

begomovirus bipartito PYMV en la América Latina, han realizado trabajos de mejoras genéticas de tomate ante este virus (Boissot *et al.*, 2008).

La importancia de evaluar cultivares resistentes a TYLCV ante otros begomovirus, es que hasta ahora en Venezuela no se han realizado mejoramientos genéticos de cultivares de tomate para resistir a begomovirus autóctonos. De hecho en América Latina los trabajos de mejoramiento para PYMV son de reciente registro (Boissot *et al.*, 2008). Así mientras se realizan investigaciones para generar genotipos resistentes a begomovirus nativos, deben seguirse evaluando los resistentes ante otras especies de estos virus, para así descartar aquellos que muestren susceptibilidad ante los begomovirus autóctonos y continuar evaluando aquellos que muestren resistencia a los mismos y que puedan resultar promisorios para el manejo de este importante problema fitosanitario.

Estos resultados muestran que un cultivar de tomate mejorado para un begomovirus específico, no necesariamente es resistente a otros begomovirus. Esto fue previamente señalado por Chirinos *et al.* (2012), con base a los resultados obtenidos al evaluar genotipos mejorados para resistir la infección del TYLCV, ante la cual se comportaron como asintomáticas pero mostraron síntomas de ToVEV.

Esta respuesta diferencial se explica en parte por el hecho que los begomovirus monopartitos presentan características genéticas diferentes a los

bipartitos (Zuñiga-Vega y Ramírez, 2002; Hull, 2004). Por otro lado, en este trabajo se encontraron diferencias en cuanto a manifestación de síntomas y porcentajes de infección entre los cultivares resistentes al TYLCV ante el ToVEV. Un ejemplo de ello, la severidad de los síntomas observada en las plantas El Cid, comparadas con Alba y Shan TY. Estas diferencias se deben a los genes que han sido mejorados para resistir a un begomovirus en particular no necesariamente funcionan para otros begomovirus (Gilbertson *et al.*, 2011).

Es importante señalar que la manifestación de síntomas y el porcentaje de infección no son los únicos parámetros a ser considerados para determinar la susceptibilidad o resistencia de un cultivar ante un begomovirus. Otras medidas tales como algunos parámetros biométricos en las plantas, deben ser considerados con el fin de medir el verdadero efecto de este, que es el objeto del siguiente capítulo de este trabajo.

Los cultivares Alba, El Cid y Shan TY promocionados como resistentes al begomovirus TYLCV, mostraron síntomas de ToVEV en más de la mitad de las plantas evaluadas, síntomas que resultaron más severos en El Cid. Esto sugiere que un cultivar mejorado como resistente a un begomovirus específico no necesariamente es resistente ante la infección de otros begomovirus. No obstante, además de evaluar la aparición de síntomas y porcentajes de infección, deben ser considerados otros parámetros, tales como, algunos biométricos, con el fin corroborar la susceptibilidad del genotipo ante la infección de aquellos begomovirus de importancia.

CAPITULO II

EFFECTO DE LOS BEGOMOVIRUS TYLCV Y TOVEV SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS BIOMÉTRICOS EN CUATRO CULTIVARES DE TOMATE

Introducción

El efecto negativo de los virus fitopatogénicos se debe a la interferencia con algunas funciones fisiológicas de la planta, lo cual incide directamente en su desarrollo y producción (Agris, 2005), reconocidos por síntomas característicos de cada caso. En tomate, las infecciones por begomovirus, constituyen uno de los principales factores de estrés bióticos que limitan el crecimiento y reproducción de las plantas (Sehrish *et al.*, 2014), incidiendo directamente en la cantidad y calidad de los frutos, lo cual se traduce en considerables pérdidas, compensado con genotipos resistentes (Lapidot *et al.*, 1997; Lapidot *et al.*, 2001), lo cual puede significar más del 50% de producción (Puertas *et al.*, 2003). Así mismo, características como altura, número y tamaño de frutos y área foliar, son algunos de los parámetros a ser considerados al evaluar el efecto de begomovirus (Romay *et al.*, 2010, Anjaneya *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2011).

Dada la relevancia que TYLCV y ToVEV tienen por su incidencia en tomate en Venezuela (Geraud-Pouey *et al.*, 2009b, Güerere, 2013), además de la eficiencia de transmisión y manifestación de síntomas, ameritaba evaluar los

efectos de estos virus en el desarrollo y producción del cultivo. Por lo anteriormente expuesto, esta fase del trabajo se planteo como una primera aproximación para evaluar el efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV sobre algunos parámetros biométricos en los 4 cultivares de tomate, tres de los cuales son seleccionados para resistencia a TYLCV y uno susceptible.

MATERIALES Y METODOS

Medición de parámetros biométricos

La medición de parámetros biométricos se realizó en parte de las plantas provenientes del ensayo de transmisión (ver Capítulo I). En el caso de plantas expuestas a los virus, fueron seleccionadas entre aquellas que habían mostrado síntomas a los 30 días del PAI, cuando las hubo, puesto que para el caso de TYLCV, con excepción de Río Grande, hubo muy escasa manifestación de los mismos, mientras que con ToVEV, todos los cultivares mostraron síntomas, aunque todas las plantas expuestas a transmisión de virus, resultaron positivas en los análisis de PCR, denotando infección viral (Capítulo I). Se realizaron 3 muestreos: a los 30, 60 y 90 días, el primero en las plantas aun en macetas de 3 L. Las restantes fueron trasplantadas a macetas de 9 L para que su desarrollo en los subsiguientes muestreos no fuese limitado. Al igual que lo referido en el capítulo anterior, fueron evaluados 12 tratamientos, en este caso con cuatro repeticiones. La unidad experimental consistió de tres plantas, una a ser evaluada en cada muestreo destructivo. Esto representó un total de 144 plantas.

Las plantas en macetas de 9L (96 plantas restantes, para el segundo y tercer muestreo), fueron colocadas a plena exposición solar en un espacio de 15 X 8 (largo x ancho), dispuestas en cuatro hileras, separadas a 2 m x 0,5 m (hileras x plantas). Cada planta fue tutorada con una varilla de alambre galvanizado de 2 mm de diámetro y 1 m de longitud. Las plantas fueron regadas diariamente y fertilizadas cada semana con una formula completa (18-18-18, alta solubilidad, Solub®) a razón de 1g por planta. Para evitar el resurgimiento de las poblaciones de moscas blancas hasta la culminación del experimento, se aplicó el insecticida sistémico imidacloprid (Relevo® 500) a 0,35 g. L⁻¹, cada 21 días.

Las variables evaluadas fueron la altura de la planta (cm), área foliar (cm²), número de hojas, número de frutos, peso de frutos (g) y peso secos (hojas + tallos; g) de la planta. La altura se midió en las plantas aun en las macetas, luego éstas fueron cortadas a ras del suelo, con una tijera, colocadas individualmente dentro de una bolsa plástica de 20 L de capacidad (para mantenerlas turgentes) y llevadas al laboratorio, donde cada planta fue seccionada en hojas, tallo y frutos. Para medir el área foliar se seleccionaron cinco (5) hojas representativas del tercio medio de cada planta, las cuales se fotografiaron individualmente con una cámara digital y procesadas con el programa Image Pro Plus, versión 6.10 (2008). Luego, estas hojas fueron retornadas a sus respectivas muestras y colocadas en una bolsa de papel y sometidas a secado en una estufa a 60°C por 48 horas, para la posterior

medición del peso seco, usando una balanza electrónica de cuatro dígitos y dos decimales.

Diseño experimental y análisis de datos

El diseño experimental fue un bloque al azar con 12 tratamientos y cuatro repeticiones. La unidad experimental consistió de tres (3) plantas/tratamiento/repetición. Las comparaciones de medias fueron realizadas mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Los análisis estadísticos fueron hechos con el programa estadístico SAS 6.0 1996 (Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la realización de este ensayo se utilizaron parte de las plantas provenientes del ensayo de transmisión (tal como fue explicado con detalle en materiales y métodos), estas fueron mantenidas por 30 días en jaula umbráculo. El desarrollo alcanzado por las plantas al final de ese periodo, sobrepaso el espacio disponible dentro de las jaulas, ocasionando ligera etiolación a consecuencia de la competencia entre plantas (Figura 10). Si bien, esto no afectó la aparición de síntomas, pudo haber influenciado la manifestación del efecto de los virus en el desarrollo posterior de las plantas, mitigando diferencias debido a efectos de infección viral.



Figura 10. Cultivares de tomate expuesto a los diferentes tratamientos en las jaulas umbráculos.

Altura de la planta

Cuando las plantas fueron expuestas al TYLCV, solo en Río Grande fue afectada negativamente la altura comparado con su testigo no infectado ($P \leq 0,05$) (Figura 11), mientras que Alba, El Cid y Shan TY no presentaron diferencias significativas con este virus (Cuadro 3). En contraste, con ToVEV, aunque en todos los cultivares fue reducida la altura (Figura 11), solo en El Cid fue significativa la reducción en más del 50%, comparada con su testigo y con aquellas con infección por TYLCV ($P \leq 0,05$) (Cuadro 3). Así mismo, El Cid presentó la mayor reducción de la altura con ToVEV a los 30, 60 y 90 días (Figura 11). La reducción de la altura de plantas al ser expuestas a ToVEV coincide con lo reportado por Romay *et al.*, 2010, al observar más de 50 % en la reducción de la altura en plantas de tomate susceptibles. Reducciones de altura también han sido reportadas en caso de infecciones para TYLCV (Mohamed, 2010).

Cuadro 3. Efecto de los *begomovirus* TYLCV y ToVEV en la altura (Alt) en los diferentes cultivares de tomate, transmitidos mediante *Bemisia tabaci*.

Cultivar	Tratamiento	Alt (cm)
Río Grande	Sin virus	74,82± 9,79 abc
	TYLCV	61,21± 9,51 abcd
	ToVEV	58,10 ± 11,33 cd
Alba	Sin virus	72,33 ± 10,82 abcd
	TYLCV	65,17 ± 7,1 abcd
	ToVEV	58,58 ± 7,73 bcd
El Cid	Sin virus	80,00 ± 8,94 ab
	TYLCV	80,13 ± 6,94 ab
	ToVEV	43,33 ± 8,70 d
Shan TY	Sin virus	82,33± 13,20 a
	TYLCV	78,67 ± 9,35 abc
	ToVEV	63,82 ± 22,42 abcd

Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$), letras iguales no difieren significativamente entre sí

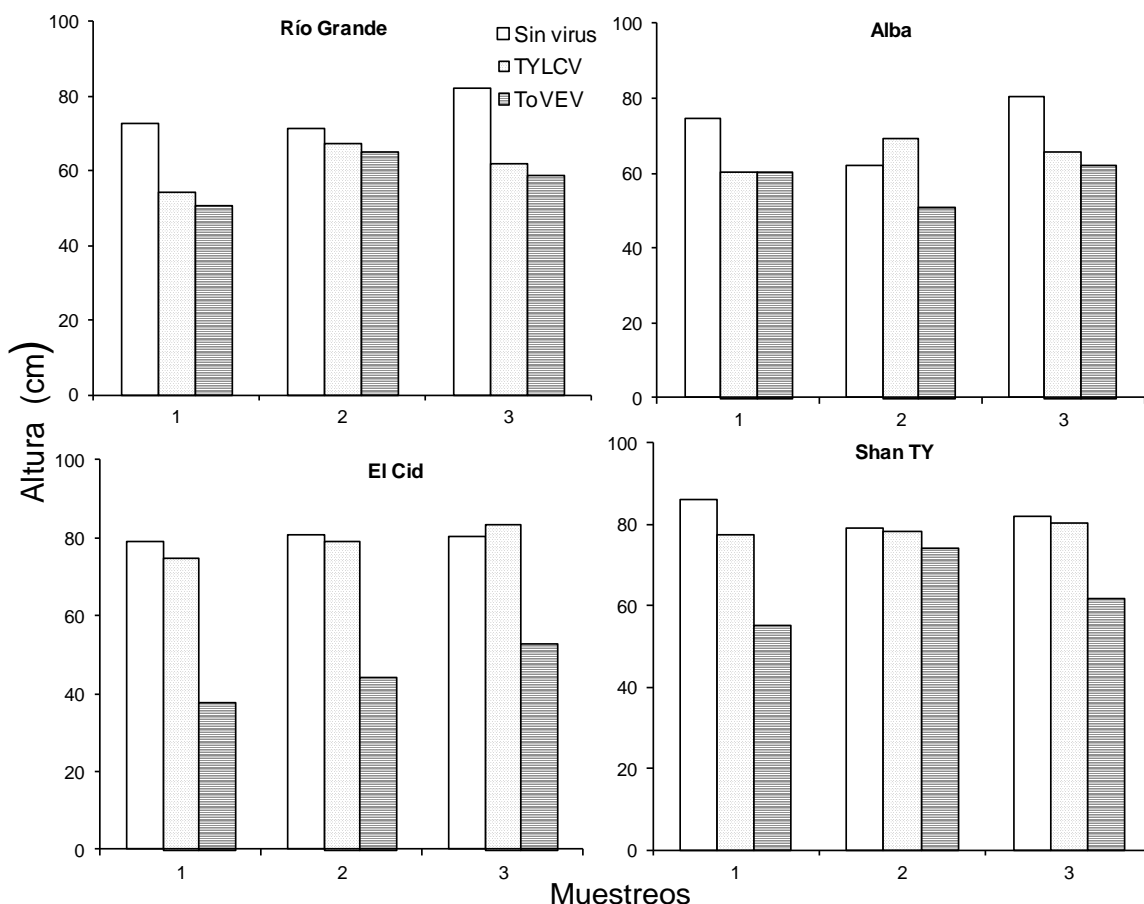


Figura 11. Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en la altura de plantas en diferentes cultivares de tomate. Muestras: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.

Área Foliar

Con ToVEV, el área foliar fue afectada negativamente en los cultivares El Cid seguido de Río Grande, pero solo significativa ($P \leq 0,05$) en el primer caso comparado con su testigo y con aquellas a TYLCV (Cuadro 4, Figura 12), con una reducción aproximada al 50%. Los acentuados síntomas observados en este cultivar con ToVEV (Capítulo I), soportan estos resultados. Alba y Shan TY no presentaron diferencias en este sentido. Para el caso del TYLCV, solo

Río Grande fue afectado con la disminución del área foliar (Cuadro 4, Figura 12). En el resto de los cultivares no hubo diferencias, de hecho a los 60 días El Cid tuvo similares valores al testigo, representando la mayor área foliar. La planta de tomate suele completar su fase vegetativa aproximadamente a los 60 días (Chirinos *et al.*, 1993). Estos resultados concuerdan con los leves síntomas y los bajos porcentajes de plantas sintomáticas (18 a 33%), referidos en el Capítulo I de este trabajo. Así mismo, los resultados obtenidos coinciden con los de Romay *et al.* (2010), donde observaron la reducción del área foliar en plantas de tomate susceptibles cuando fueron expuestas a ToVEV, solo se difiere en el hecho que en la presente investigación, se evaluaron cultivares resistentes a TYLCV. Reducción del área foliar en El Cid causado por el infección por ToVEV fue anteriormente reportado por Fernández *et al.* (2011). Además de la reducción del área foliar, las infecciones virales pueden afectar mecanismos fisiológicos relacionados con la fotosíntesis (Sampol, 2003).

Cuadro 4. Efecto de los *begomovirus* TYLCV y ToVEV en el área foliar (AF) en los diferentes cultivares de tomate, transmitidos mediante *Bemisia tabaci*.

Cultivar	Tratamiento	AF (cm²)
Río Grande	Sin virus	731,39 ± 13,42 ab
	TYLCV	550,46 ± 13,52 b
	ToVEV	461,76 ± 9,52 b
Alba	Sin virus	710,86 ± 8,25 ab
	TYLCV	656,53 ± 7,83 ab
	ToVEV	625,70 ± 8,89 ab
El Cid	Sin virus	900,36 ± 22,67 a
	TYLCV	832,60 ± 15,67 a
	ToVEV	449,20 ± 10,03 b
Shan TY	Sin virus	793,10 ± 10,11 ab
	TYLCV	757,96 ± 10,21 ab
	ToVEV	581,70 ± 13,90 ab

Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$), letras iguales no difieren significativamente entre sí

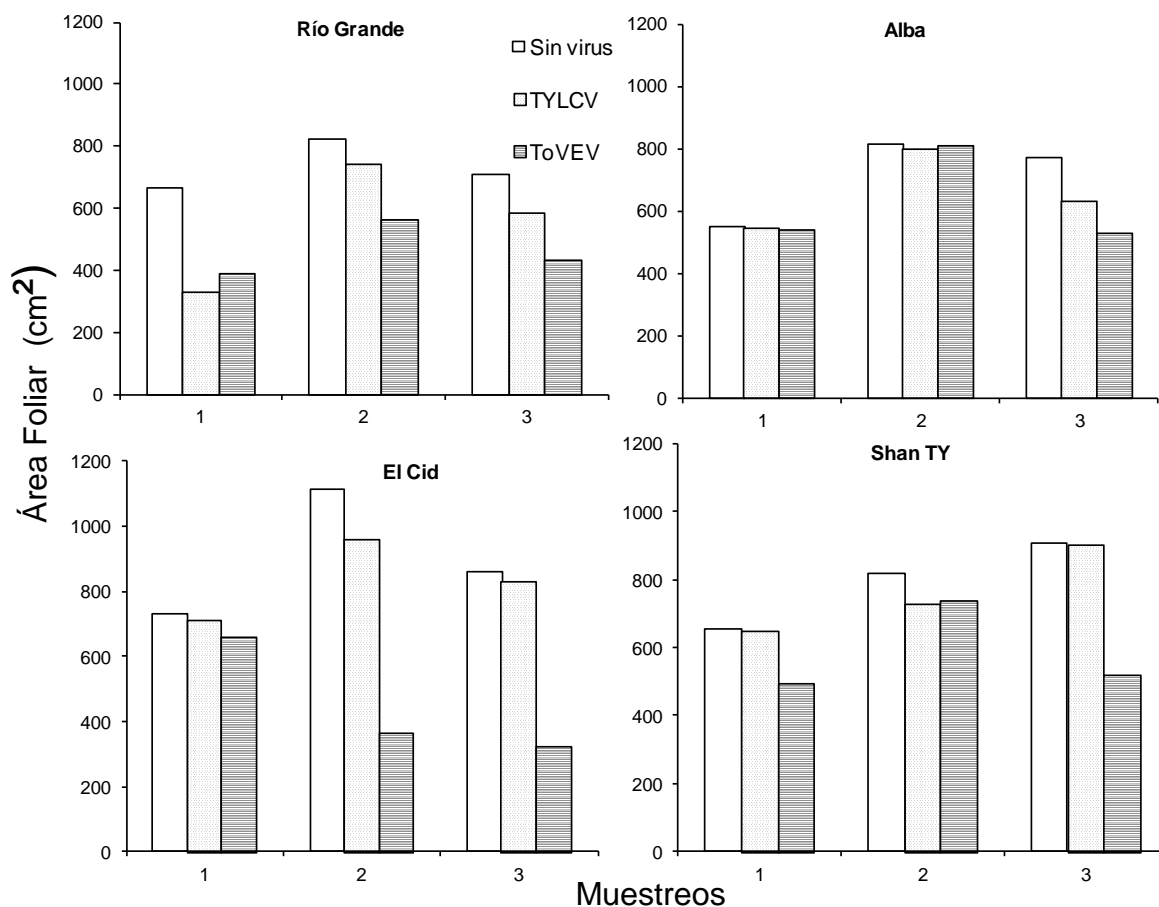


Figura 12. Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en el área foliar total en los diferentes cultivares de tomate. Muestras: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.

Número de hojas

Con TYLCV, no se detectó diferencias significativas en la disminución del número de hojas entre los cultivares evaluados ($P \leq 0,05$) (Cuadro 5), coincidiendo esta tendencia con los valores de área foliar en los cultivares expuestos a este virus. Con ToVEV, El Cid fue el más afectado comparado con su testigo y con plantas infectadas con TYLCV ($P \leq 0,05$) (Cuadro 5, figura 13).

Cuadro 5. Efecto de los *begomovirus* TYLCV y ToVEV en el número de hojas (NH) en los diferentes cultivares de tomate, transmitidos mediante *Bemisia tabaci*.

Cultivar	Tratamiento	NH
Río Grande	Sin virus	55,11± 10,98 a
	TYLCV	40,40 ± 7,33 a
	ToVEV	27,18 ± 4,66 a
Alba	Sin virus	51,42 ± 13,25 b
	TYLCV	47,33 ± 11,68 b
	ToVEV	49,17 ± 11,65 b
El Cid	Sin virus	40,50 ± 24,46 b
	TYLCV	33,29 ± 5,49 ab
	ToVEV	11,90 ± 0,97 a
Shan TY	Sin virus	47,67 ± 8,63 a
	TYLCV	36,50 ± 7,32 a
	ToVEV	26,75 ± 3,78 b

Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$), letras iguales no difieren significativamente entre sí.

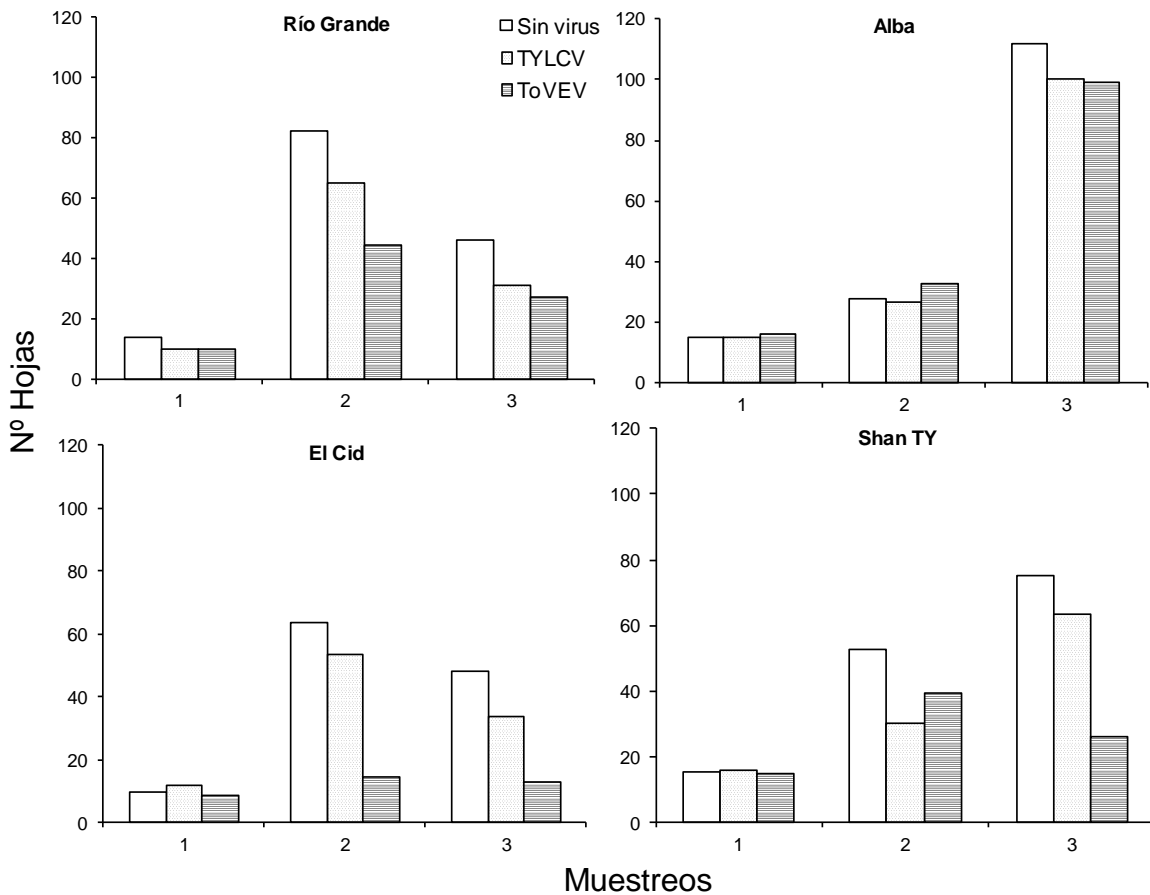


Figura 13. Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en el número de hojas en los diferentes cultivares de tomate. Muestreos: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.

Frutos: número, peso fresco y peso seco.

Con TYLCV, solo en Río Grande se observó reducción del número de frutos ($P \leq 0,05$) (Cuadro 6), sin afectar el de peso fresco en ninguno de los cultivares; pero sí se evidenció reducción en el peso seco en Río Grande ($P \leq 0,05$). La

diferencia entre peso fresco y peso seco, depende de las características de los frutos de cada cultivar, así como de la cantidad de sólidos totales.

Con ToVEV, solo se apreció una disminución significativa en el número de frutos en El Cid ($P \leq 0,05$) (Cuadro 6, Figura 14). Para el peso fresco de frutos, la disminución significativa ($P \leq 0,05$) por el efecto de este virus fue observado en Río Grande, Alba y El Cid (Cuadro 6, Figura 14), sin embargo, solo se observó reducción de peso seco de los frutos por ToVEV en los cultivares Río Grande y El Cid, este último cultivar fue el más afectado ($P \leq 0,05$) (Cuadro 6 (Figura 14). Partiendo de estos resultados, se puede inferir que TYLCV no afectó el rendimiento (número y pesos de frutos) en los cultivares evaluados mejorados para este virus. Con ToVEV, hubo un efecto negativo en El Cid y Río Grande, los cuales mostraron la mayor disminución en el número y pesos de frutos. Las plantas susceptibles a begomovirus reducen significativamente el número y peso de frutos comparados con plantas sanas (Murguido *et al.*, 2001). Contrario a cultivares susceptibles, en algunas líneas de tomate mejoradas para TYLCV, se han obtenido altos rendimientos (Puertas, 2003).

Cuadro 6. Efecto de los *begomovirus* TYLCV y ToVEV transmitidos mediante *Bemisia tabaci*, en: número (Nº), peso fresco (PF) y peso seco (PS) de frutos por planta, en los diferentes cultivares de tomate.

Cultivar	Tratamiento	Nº	PF (g)	PSF(g)
Río Grande	Sin virus	2,80 ± 1,69 a	29,54 ± 4,92 a	11,64 ± 1,73 bc
	TYLCV	2,35 ± 1,22 b	31,89 ± 11,24 a	7,41 ± 1,27 c
	ToVEV	3,54 ± 1,91 a	20,39 ± 11,25 c	7,72 ± 1,23 c
Alba	Sin virus	4,02 ± 2,45 a	35,66 ± 5,94 a	17,53 ± 2,46 abc
	TYLCV	10,06 ± 8,93 a	36,19 ± 5,79 a	14,49 ± 2,02 abc
	ToVEV	5,18 ± 3,81 a	34,78 ± 6,56 b	13,12 ± 1,83 abc
El Cid	Sin virus	4,65 ± 3,11 a	67,44 ± 11,24 a	35,08 ± 4,97 a
	TYLCV	5,72 ± 3,86 a	67,54 ± 5,3 a	30,79 ± 4,41 a
	ToVEV	2,33 ± 1,41 b	23,95 ± 8,87 bc	16,62 ± 2,41 abc
Shan TY	Sin virus	8,04 ± 6,11 a	34,78 ± 5,79 b	15,51 ± 2,08 abc
	TYLCV	9,14 ± 7,35 a	39,38 ± 6,03 b	14,28 ± 1,91 abc
	ToVEV	8,05 ± 6,09 a	39,25 ± 3,39 b	10,74 ± 1,48 abc

Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Tukey (P≤0,05), letras iguales no difieren significativamente entre sí

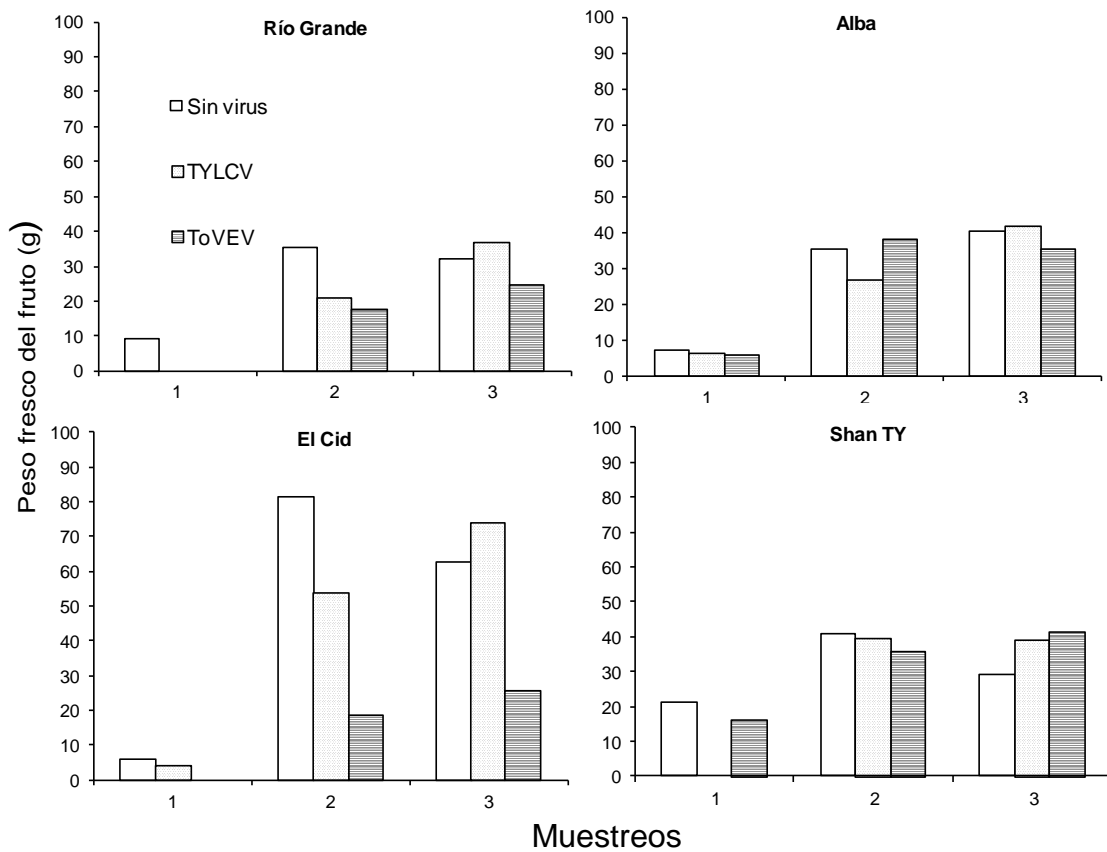


Figura 14. Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en el peso fresco de frutos en los diferentes cultivares de tomate. Muestras: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.

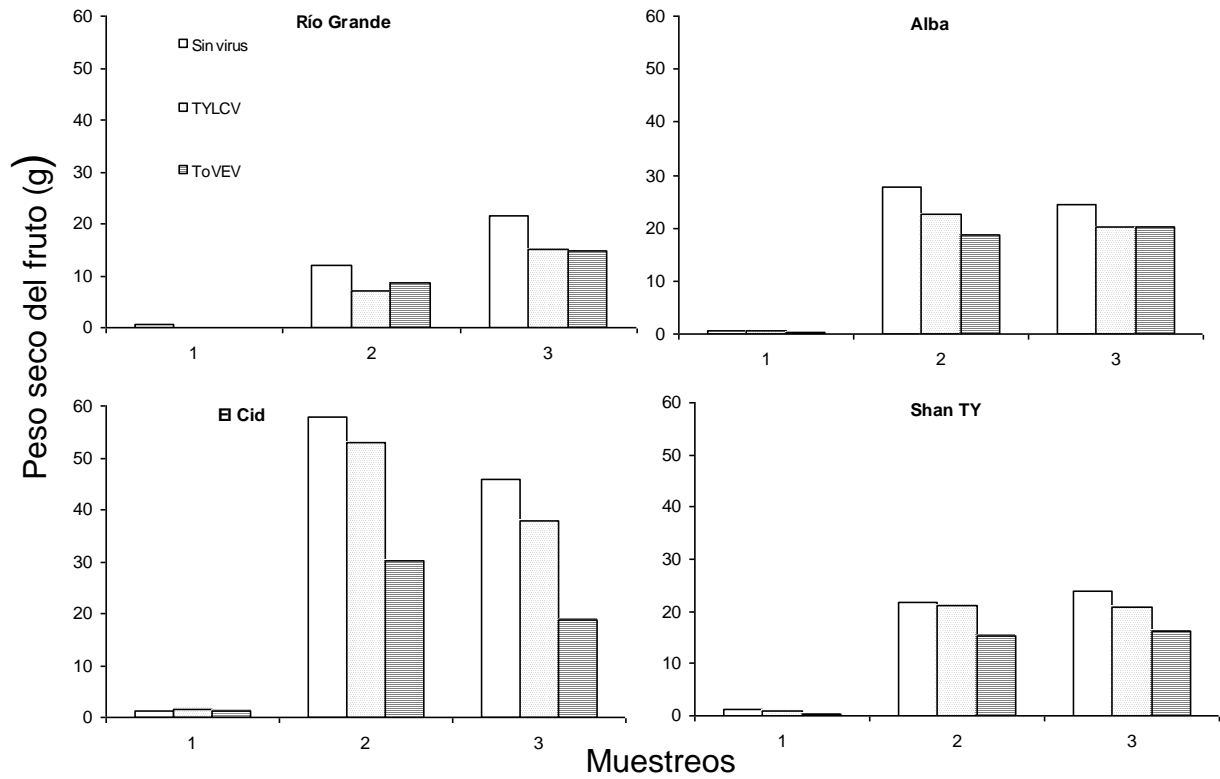


Figura 15. Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en el peso seco de frutos en los diferentes cultivares de tomate. Muestrros: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.

Pesos secos totales (Hojas + tallos)

Con TYLCV, solo Río Grande fue afectado negativamente con la infección de este virus ($P \leq 0,05$) (Cuadro 7). Para Alba, El Cid y Shan TY no hubo diferencias al compararlas con las plantas sin virus (Figura 16), el tomate cuando no es afectado su crecimiento puede acumular la mayor cantidad de materia seca hasta los 120 días (Chirinos-Torres *et al*, 1999). Para el caso de ToVEV, a excepción de Alba, el resto de los cultivares fueron severamente afectados ($P \leq 0,05$). El Cid mostró la mayor disminución de peso seco, lo cual lo hace un cultivar muy sensible a ToVEV, esto coincide con lo encontrado por Fernández *et al.* (2011).

Cuadro 7. Efecto de los *begomovirus* TYLCV y ToVEV en los pesos secos totales (Hojas + tallos) en los diferentes cultivares de tomate, transmitidos mediante *Bemisia tabaci*.

Cultivar	Tratamiento	Peso seco total (g)
Río Grande	Sin virus	24,89 ± 3,46 ab
	TYLCV	16,82 ± 2,54 b
	ToVEV	18,45 ± 2,46 b
Alba	Sin virus	36,07 ± 4,93 ab
	TYLCV	30,99 ± 4,05 ab
	ToVEV	29,24 ± 3,66 ab
El Cid	Sin virus	71,16 ± 9,94 a
	TYLCV	63,58 ± 8,83 a
	ToVEV	36,25 ± 4,83ab
Shan TY	Sin virus	32,03 ± 4,17 ab
	TYLCV	30,57 ± 3,83 ab
	ToVEV	24,48 ± 2,97 ab

Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$), letras iguales no difieren significativamente entre sí.

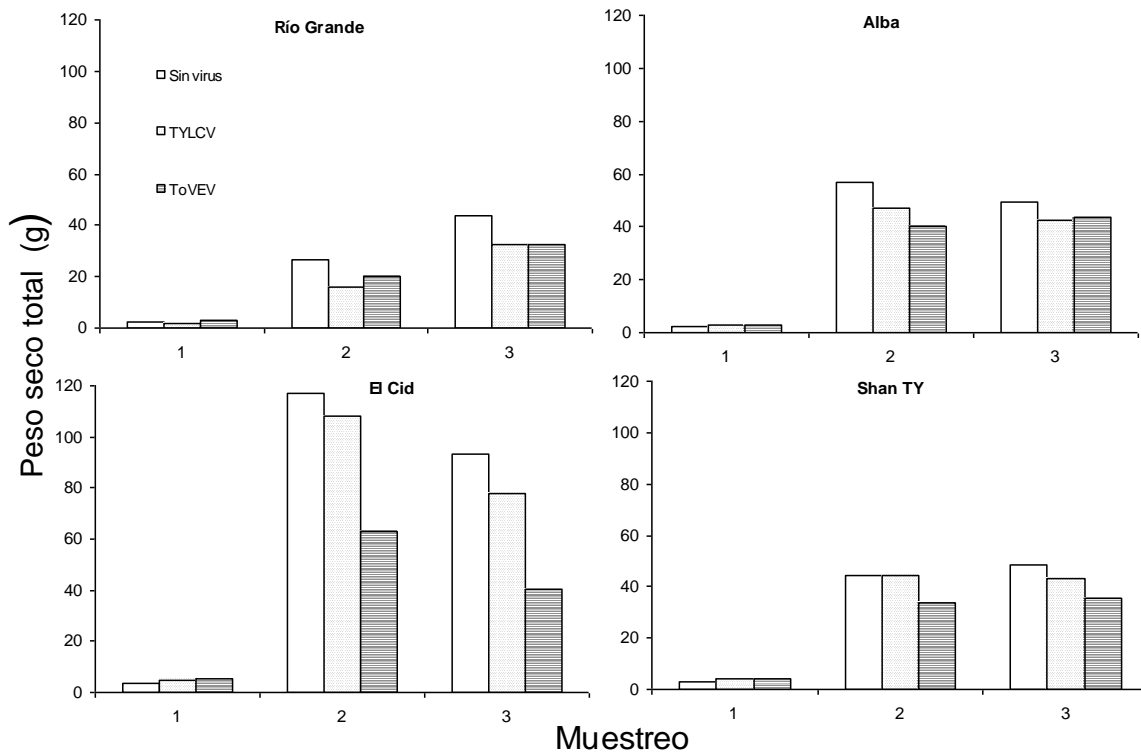


Figura 16. Efecto de los begomovirus TYLCV y ToVEV en el peso seco total en los diferentes cultivares de tomate. Muestreos: 1=30, 2=60 y 3=90 días después del trasplante.

CONCLUSIONES

Los cultivares Alba, El Cid y Shan TY promocionados como resistentes al begomovirus TYLCV, mostraron síntomas ante el ToVEV en más de la mitad de las plantas evaluadas, los mismos resultaron más severos en El Cid. Así mismo, el efecto del TYLCV en los parámetros de crecimiento evaluado, se observó que en Alba, El Cid y Shan TY no hubo afectación. Mientras que al medir estos parámetros con ToVEV, en todos los cultivares hubo disminución de las variables evaluadas, en mayor proporción en El Cid y Río Grande, resultando este último el más limitado con este virus. El Cid un cultivar mejorado a TYLCV, resultó severamente afectado por ToVEV.

Todas las plantas expuestas a virus, resultaron positivas a los mismos con PCR, lo cual evidencia apreciables niveles de tolerancia o resistencia a esos begomovirus, en los casos en que no pasaron de mostrar leves síntomas y no afectaron considerablemente el desarrollo y producción de las plantas.

RECOMENDACIONES

- Evaluar por separado la eficiencia de transmisión y el efecto de los virus en el desarrollo y producción de las plantas, tanto en macetas como en el campo bajo manejos agronómicos usuales.
- Complementar con la evaluación de la calidad agroindustrial de los frutos.

LITERATURA CITADA

Anjaneya, R.B., Patil, M.S., Rajaserakaraman T. 2010. Effect of tomato leaf curl virus infection on plant growth and yield in tomato. *Kanataka J. Agric. Sci.* 23 : 806.

Agrios, G. 2005. *Plant pathology*. Fifth edition. Elsevier academic press. 948 pp.

Argüello-Astorga, G. and Ruiz-Medrano, R. 2001. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch. Virol.* 146: 1465–1485.

Accotto, G., Navas-Castillo, J., Noris, E., Moriones, E., Louro, D. 2000. Typing of Tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *Europ. J. of Plant Path.* 106:179-186.

Boissot, N., Urbino, C., Dintinger, J., Pavis, C. 2008. Vector and graft inoculations of *Potato yellow mosaic virus* reveal recessive resistance in *Solanum pimpinellifolium*. *Ann. Appl. Biol.* 152: 263-269.

Brown, J.K., Frohlich, D.R., Rosell, R.C. 1995. The sweetpotato of silverleaf witheflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or species complex? *Annu. Rev. Entomol.* 40: 511-534.

Chirinos, D., Geraud, F., Marin, M., Rivero, G., Vergara, J., Moyeda, J., Mármol, L., Atencio, A. 1993. Desarrollo de la planta de tomate, *Lycopersicon esculentum* Miller, cv Río Grande, en la zona del río Limón del estado Zulia, Venezuela. I. Altura de planta, peso fresco, peso seco, número de ramificaciones, hojas, flores y frutos. Revista Facultad de Agronomía, LUZ. 10: 311-324.

Chirinos-Torres, D., Chirinos-Torres, L., Marín, M., Román-Urbina, Z., Vielma-Baptista, J., Castro, C. 1999. Dinámica de acumulación de materia seca en la planta de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller), cv. Río Grande, en la zona noroccidental del estado Zulia, Venezuela. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16: 141-151.

Chirinos, D.T., Guerere, P., Geraud-Pouey, F., Romay, G., Santana, M.A, Bastidas, L. 2009a. Transmisión experimental de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) por *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) a algunas solanáceas en Venezuela. Rev. Colomb. Entomol. 35: 22-27.

Chirinos, D.T, Geraud-Pouey, F. 2011. El manejo de plagas agrícolas en Venezuela. Análisis y reflexiones sobre algunos casos. Interciencia 36: 192-199.

Chirinos, D.T, Paradiso, M.G., Dávila, R., Geraud-Pouey F. (2011). Efecto del imidacloprid sobre la transmisión de un *Begomovirus* por *Bemisia tabaci* en tomate. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 28: 73-82.

Chirinos, D.T, Geraud-Pouey F., Romay G., Guerere Pascual., Franco, M.A.,Galindo-Castro, I. 2012. Evaluación de genotipos comerciales de tomate por su resistencia a begomovirus. *Interciencia* 37: 451-456.

Chirinos, D.T., Geraud-Pouey, F., Romay, G., Fernández, C., Bastidas, L., Flores, L., Guerere, P. 2014. Infección por begomovirus en plantas de tomate propagadas bajo diferentes condiciones de protección física de semilleros. *Bioagro* 26: 57-62.

Chu, D., Wan, F., Xu , B., Wu, Q., Zhang, Y. 2008. Comparative analysis of population genetic structure in *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes B and Q based on ISSR marker. *Agricult. Sci. China*. 7: 1348-1354.

Cortés, S and López, C. 2011. Gene silencing and applications for functional gene validation. The case of geminivirus. *Agron. Colomb.* 29: 27-34.

Coutts, R.H., Coffin, R.S., Roberts, E.J.F., Hamilton, W.D.O. 1991. The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of *Potato yellow mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* 72: 1515–1520.

Czosnek, H., Kheyr-Pour, A., Gronenborn, B., Remetz, E., Zeidan, M., Altman, A., Rabinowitch, H., Vidavsky, S., Kedar, N., Gafni Y., Zamir D. 1993. Replication of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA in agroinoculated leaf discs from selected tomato genotypes. *Plant. Mol. Biol.* 22: 995-1005.

Debrot, E., Herold, F. y Dao F. 1963. Nota preliminar sobre un “mosaico amarillento del tomate” en Venezuela. *Agron. Trop* 13: 33–41.

De Barro, P., Liu, S., Boykin, L., Dinsdale, A. 2011. *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. *Ann Rev Entom.* 56:1-19

Fao 2014. Statistic Division, Faostat. [En línea]: URL: < <http://faostat.fao.org> [Consultado el 01 de julio de 2014].

Faria, A. and Nava, A. 2009. Detección por PCR de *Begomovirus* en el cultivo del tomate en las áreas productoras de los Andes venezolanos. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 26: 179-195.

Fauquet, C. M., Maxwell, D. P., Gronenborn, B., Stanley, J. 2000. Revised proposal for naming geminiviruses. *Arch. Virol.* 145: 1743-1761.

Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. 2005. Virus taxonomy: eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, London, San Diego, 1162 p.

Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., Zhou, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol.* 153: 783–821.

Fereres, A., Moreno, A. 2009. Behaviour aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Res.* 141: 158-168.

Fernández, C., Chirinos J., Mejías, J., Gómez, A., Geraud-Pouey, F., Chirinos, D.T., Romay, G. 2011. Crecimiento de cuatro accesiones de

tomate (*Solanum lycopersicum* L.) infectados con el Virus del tomate de Venezuela (ToVEV). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 28: 291-300.

Frohlich, D., Torres-Jerez, I. Bedford, P., Brown, J.K. 1999. A phylogeographic analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. Mol. Ecol. 8: 1593-1602.

Gafni, Y., Epel, B. 2002. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. Physiological and molecular Plant pathology. 60: 231-241.

Geraud-Pouey, F., Chirinos, D.T., Rivero, G. 1995. Artrópodos asociados con el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Venezuela. Bol. Entomol. Venez. 19: 31-49.

Geraud-Pouey, F., Chirinos, D.T., Romay, G., Galindo, I., Franco, M.A., Santana, M., Cermeli, M. 2009a. Primer avance de un inventario de Begomovirus en tomate, otros cultivos y plantas espontáneas en Venezuela. XXI Congreso Venezolano de Fitopatología. Isla de Margarita. 3-6 noviembre. En resúmenes.

Geraud-Pouey, F., Chirinos, D.T., Romay, G., Santana, M.A., Bastidas, L., Flores, L. 2009b. Transmisión del TYLCV a diferentes materiales de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) mediado por el Biotipo B del complejo *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Venezuela. Bioagro 21: 23-31.

Gilberston, R.L., Rojas, M.R., Rusell, D.R., Maxwell, D.P. 1991. Use of asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of *Bean golden mosaic geminivirus* in the Dominican Republic. *J. Gen. Virol.* 72: 2843-2849.

Gilberston, R.L., Rojas, M., Natwick, E. 2011. Development of Integrated Pest Management (IPM) Strategies for Whitefly (*Bemisia tabaci*) – Transmissible Geminiviruses. Cap 12. En: *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-infected Hosts Plants. Winston Thompson (Ed.). Springer. 396 p.

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

Gómez, O., Piñón, M., Martínez, Y., Quiñonez, M., Fonseca, D., Laterrot, H. 2004. Breeding for resistance to *Begomovirus* in tropic-adapted tomato genotypes. *Plant. Breed.* 123: 275-279.

Güerere, Pascual. 2013. Evaluación de la transmisión del tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-MId) en hospederas alternas cultivadas y silvestres mediante el biotipo B de mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) (Hemiptera: Aleyrodidae). Universidad e Córdoba, Servicio de Publicaciones. <http://hdl.handle.net/10396/10992>.

Guzman, P., Arredondo, C.R, Emmatty, D., Portillo, R., and Gilbertson, R.1997. Partial characterization of two whitefly-transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant. Dis.* 81: 312.

Greathead, A. 1986. Host plants. Cap. 3 en M.J.W. Cook (ed) *Bemisia tabaci* a literature survey on the cotton whitefly with and anoted bibliography. FAO, CAB Internacional.

Hilje, L., Costa, H. and Stansly, P. 2001. Cultural practices for managing *Bemisia tabaci* and associated viral diseases. *Crop Protection* 20: 801–812.

Hilje, L. y Stansly, P. 2008. Living ground covers for management of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) and tomato yellow mottle virus (ToYMoV) in Costa Rica. *Crop Protection* 27: 10–16

Hull, R. 2004. *Matthw's Plant Virology*. 4th ed. New York. Academic Press. 983 p.

Jones, D. 2003. Plant virus transmitted by whiteflies. *Euro. J. Plant. Pathol.* 109: 195-219.

Lapidot, M., Friedmann, M., Lachman, O., Yehezkel, A., Nahon, S., Cohen,S., Pilowsky, M. 1997. Comparison of resistance level to *Tomato yellow leaf curl virus* among commercial cultivars and breeding lines. *Plant. Dis.* 81: 1425-1428.

Lastra, J.R., Uzcátegui de, R.C. 1975. Viruses affecting tomatos in Venezuela. *Phytopathol. Z.* 84: 253-258.

Lapidot, M., Friedmann, M., Lachman, O., Yehezkel, A., Nahon, S., Cohen, S., Pilowsky, M. 1997. Comparison of resistance level to Tomato yellow leaf curl virus among commercial cultivars and breeding lines. *Plant. Dis.* 81: 1425-1428.

Lapidot, M., Friedmann, M., Pilowsky, M., Ben-Joseph, R., Cohen, S. 2001. Effect of host plant resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. *Virol.* 91 (12): 910-914.

Massumi, H., Shaabani, M., Hosseini, A., Heydarnejad, J., Rahimian, H. 2009. Incidence of virus infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant. Dis.* 93: 67-72.

Mohamed, E.F. 2010. Interaction between some viruses which attack tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants and their effects on growth and yield of tomato plants. *Journal of American Science.* 6: 311-320.

McCollum, T.G., Stoffella, P.J., Powell, C.A., Cantliffe, D.J., Hanif-Khan. 2004. Effects of silverleaf whitefly feeding on tomato fruit ripening. *Postharvest biology and technology.* 31: 184-190.

McKenzie, C.L., Albano, J.P. 2009. The effect of time of sweetpotato whitefly infestation on plant nutrition and development of tomato irregular ripening disorder. *Horticulture Technology.* 19: 353-359.

McKenzie, C.L., Bauscher, M. 2005. Deciphering Changes in plant physiological response to whitefly feeding using microarray technology. *Acta. Hort.* 695: 347-351.

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

Morales, F. 2006. History and current distribution of *Begomoviruses* in Latin America. *Adv. Virus. Res. Academic Press* 67: 127-155 p.

Moriones, E. and Navas-Castillo, J. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res.* 71: 123-134.

Nava, A., Trujillo, G., Geraud, F., Hernández, L., Lastra, R., Rivas, G. 1996. Detección de virus en zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Venezuela. I. Estados Aragua y Zulia. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 13: 285-292.

Nava, A.R., Patte, C.P., Hiebert, E., Polston, J.E. 2006. Detection and variability of *Begomoviruses* in tomato from the Andean States of Venezuela. *Plant. Dis.* 90: 61-66.

Nava, A. Londoño, A., Polston, J.E. 2012. Characterization and distribution of tomato yellow margin leaf curl virus, a begomovirus from Venezuela. *Arch. Virol.* 158: 399-406.

Polston, J., Anderson, P. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant. Dis.* 81: 1358-1369.

Polston, J.E., Anderson, P. K. 1999. Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por mosca blanca en tomate en el Hemisferio Occidental. *Man. Integ. Plag. (Costa Rica)* 53: 24-42.

Puertas, A., Suerio, L., Gómez, O., Piñon, M., Guerrero, C., Blayas, R., González, M. 2003. Comportamiento de cultivares de tomate portadores de genes de resistencia al tylocv frente a geminivirus transmitidos por mosca blanca en condiciones de bajos insumos en la región oriental de Cuba. *Rev. Protección Veg.* 18: 129-132.

Raccah, B. 2001. Plant virus transmission by insects. *Encyclopedia of Life Sciences Nature publishing group/ www.els.net.*

Rick, M. 1976. Tomato Cap. 78 en: *Evolution of Crop Plants*. Logman, London y New York. 339 p.

Roberts, E., Buck, K., Coutts, R. 1986. A new virus infecting potatoes in Venezuela. *Plant. Dis.* 77: 340-327.

Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Russell, D.R., Maxwell, D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant. Dis.* 77: 340-347

Romay, G., Geraud-Pouey, F., Chirinos, D. T., Morales, F., Herrera, E., Fernández, C., Martínez, A.K. 2010. Transmisión del virus Venezuela tomato geminivirus por *Bemisia tabaci* (Gennadius), Hemiptera: Aleyrodidae, en Maracaibo, Venezuela. Neotrop. Entomol. 39: 266-74.

Romay, G., Geraud-Pouey, F., Chirinos, D. T., Santana, M.A., Galindo-Castro, I., Márquez, L.M. 2011. Microsatellites reveal widespread predominance of an invasive over an indigenous *Bemisia tabaci* in Venezuela. Phytoparasitica. 39: 419–428.

Sampol, B., Bota, J., Riera, D., Medrano, H., Flexas, J. 2003. Analysis of de virus induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. New Phytologist. 160: 403-412.

Sehrish Mushtaq, Fakhra Shamim, Muhammad Shafique, Muhammad Slaeem Haider. 2014. Effect of whitefly transmitted geminiviruses on the physiology of tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) and tobacco (*Nicotiana benthamiana* L.) plants. Journal of natural sciences research. 4:109-118. On line

Snodgrass, R.E. 1935. Principles of Insect Morphology. McGraw-Hill. New York, London. 667p.

Stanley, J., D. M. Bisaro, R. W. Briddon, J. K. Brown, C. M. Fauquet, B. D. Harrison, E. P. Rybicki y D. C. Stenger. 2005. Geminiviridae. (In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L.A. Ball (Eds.), Virus

Taxonomy, VIII Report of ICTV (pp 301–326). Elsevier/Academic Press, London.

Wyatt, S.D and Brown, J.K. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathol.* 86:1288–1293.

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

Zambrano, k., Geraud-Pouey, F., Chirinos, D., Romay, G., Marys, E. 2011. Tomato chlorotic leaf distortion virus, a new bipartite begomovirus infecting *Solanum lycopersicum* and *Capsicum chinense* en Venezuela. *Arch. Virol.* 156: 2263-2266.

Zambrano, K., Fernández-Rodríguez, T., Marys, E. 2012. Molecular characterization of new begomovirus that infects *Euphorbia heterophylla* and *Solanum lycopersicum* in Venezuela. *Arch. Virol.* 157: 379–382

Zuñiga-Vega, C. y Ramírez, P. 2002. Los geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Man. Integ. Plag. Agroecol. (Costa Rica)* 64: 25-33.