

# Ministerio de Educación Superior

**Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas**

**Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas**

**Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas**

Identificación y aprovechamiento de fuentes de resistencia en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), frente a begomovirus que afectan al cultivo

**Francisco Dueñas Hurtado**

**Mayabeque**

**2012**

# Ministerio de Educación Superior

**Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas**

**Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas**

**Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas**

Identificación y aprovechamiento de fuentes de resistencia en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), frente a begomovirus que afectan al cultivo

**Autor: Lic. Francisco Dueñas Hurtado, MSc**

**Tutor: Lic. Marta A. Álvarez Gil, Dra C**

**Lic. Yamila Martínez Zubiaur, Dra Cs**

**Mayabeque**

**2012**

***Hay** sueños para los cuerdos,  
hay sueños para los locos,  
hay sueños para las piedras,  
hay sueños para los muertos,  
hay sueños para la tierra.  
Yo sé los sueños que quedan,  
los sueños que todavía  
andan vibrando en nosotros,  
regando con alboroto  
su misteriosa armonía.  
Yo sé los sueños descalzos,  
desnudos, dueños del día,  
fraternos, vírgenes, mansos,  
reveladores del cántaro  
de la poesía.*

*Hay sueños que se nos duermen,  
hay sueños que llegan tarde  
pero encuentran su estación.  
Los sueños son ese instante,  
la luz que ve el caminante  
debajo del corazón.  
Yo sé los sueños que mueren,  
eternos pájaros rotos,  
son esos que nos padecen,  
son esos los que adolecen  
de no vivir en nosotros.  
Yo sé los sueños que muerden  
donde la carne no sabe,  
herida oscura que azota,  
coartada de la derrota,  
dolor quemando sus naves.*

*Hay sueños que se nos duermen,  
hay sueños que llegan tarde  
pero encuentran su estación.  
Los sueños son ese instante,  
la luz que ve el caminante  
debajo del corazón.  
Y esperan en una canción.*

*"Los sueños" Liuba María Hevia*

## **Agradezco:**

*A la vida por permitirme vivirla y disfrutarla al ritmo, momento, intensidad y deseos que me permite.*

*De manera especial, a la Dra. María José Díez Niclós de la Universidad Politécnica de Valencia, por el apoyo incondicional con artículos, tesis, intercambios de conocimientos y aclaraciones de dudas en la distancia. Porque no ha dejado de ser un faro cuando hay luces que llegan a apagarse.*

*A mis tutoras Dras. Yamila Martínez y Marta A. Álvarez, por acompañarme en este camino de formación profesional. A Yamila, además, por abrirme las puertas en el CENSA para hacer los trabajos con su equipo; por la seguridad que me inspiró en los primeros momentos cuando las “cosas” no parecían salir y siempre me decía que todo estaba bien. A Marta, además, por saberme conducir por ese hilo mágico del conocimiento que trasmite en cada espacio de debate; por vivir este último año a una potencia máxima en cada instante y endulzar mis estados de ánimos; por su amistad.*

*Al Dr. Alejandro Fuentes y el colectivo de Plantas del CIGB por el apoyo en la gran mayoría de los experimentos y sacar las “castañas del fuego” de una gran parte de los resultados que se exponen en este documento; por su amistad.*

*A las doctoras y doctores María Caridad González, Belkis Peteira, Madelaine Quiñones, Mayté Piñón, Idioleidy Álvarez, Carlos de la Fe, Antonio Casanova, Liliana del Valle y María José Díez por la lectura, revisión y propuestas de cambios en el documento que enriquecieron el mismo.*

*A la cooperación internacional por el apoyo financiero a través de la: Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID), del Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación de España (MAEC); Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA); la Coordinación para el Perfeccionamiento de la Educación Superior (CAPES), de Brasil, que me permitieron la participación en cursos internacionales realizados en Argentina y España así como, una estancia de investigación doctoral en Brasil contribuyendo a la solidez del conocimiento, al intercambio cultural, a establecer futuros vínculos de trabajo, a aplicar y transmitir lo aprendido en Cuba y para establecer amistades duraderas.*

*En este sentido:*

*Al Dr. Sergio Rodríguez Lenardon, profesor@s y estudiant@s del Tercer Curso Internacional INTA-JICA “Caracterización, diagnóstico, epidemiología y manejo de enfermedades virales y mollicutes en plantas”, celebrado en la ciudad de Córdoba, Argentina.*

*Al Dr. Javier Romero, profesor@s y estudiant@s del “XVIII Curso internacional teórico-práctico sobre detección e identificación de virus, viroides y fitoplasmas”, celebrado en la ciudad de Madrid, España.*

*A las Dras. Isaura Martín, Lucía de la Rosa, profesor@s y estudiant@s de “XIV Curso Internacional sobre Conservación y Utilización de Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación”, celebrado en la ciudad de Alcalá de Henares, España.*

*y a los Drs. Derly José Henriques da Silva y Francisco Murilo Zerbini Junior, de la Universidade Federal de Viçosa por su acogida y guía en los experimentos realizados en Brasil; por sus conocimientos.*

*Al INCA por el empeño fecundo de formación constante y sostenida de sus profesionales. ¡Que esta divisa no cambie!*

*A mi grupo de trabajo por permitirme ser parte de ellos, aprender de ellos y mostrarme los disímiles rostros de un “mundo” totalmente desconocido (Marta, Marilyn, Dagmara, Mecha, Julita, Moya, Eduardo, Alexis, Noel).*

*A las muchachitas del grupo de Virología Vegetal del CENSA (Yenne, Tere, María, Made, Loidys, Bertica).*

*A Lourdes Bao y Jorge González, por el apoyo incondicional, la amistad y los buenos tiempos compartidos.*

*A mis profes de siempre Xonia, Clarita, Marlyn, Ester y María Isabel.*

*A los “Quijotes” de la Liliana Casanova, Aleyda y Julio por su amistad, respeto, conocimientos y por tenerme en cuenta para entender a los “Molinos”*

*A todos mis amigos y amigas, que en cualquier lugar que estén siempre hacen tanta falta y mucho.*

*A los que siempre están ahí para escucharme.*

*A mi familia toda, que también ha estado pendiente de mi crecimiento y porque son parte indisoluble de la raíz principal de dónde venimos.*

*A tod@s los que de una forma u otra me han colaborado en este viaje.*

**El autor.**

*Dedico:*

*a quien es parte muy importante de este sueño,*

*a quien ha velado incansablemente por la realización de otros míos,*

*al motor de empuje espiritual y físico de esta cosecha,*

*a la guajira auténtica que ama la tierra, la lluvia y los campos, con el mismo espíritu de la naturaleza,*

*a mi Madre.*

## Citación correcta Norma ISO 690

### **Según Sistema de Referencia Apellido, año**

Dueñas Hurtado, Francisco. 2012. Identificación y aprovechamiento de fuentes de resistencia en tomate (***Solanum lycopersicum*** L.), frente a begomovirus que afectan al cultivo. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas. 100 p.

### **Según Sistema de Referencia Numérico**

Dueñas Hurtado, Francisco. Identificación y aprovechamiento de fuentes de resistencia en tomate (***Solanum lycopersicum*** L.), frente a begomovirus que afectan al cultivo. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, 2012. 100 p.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>6</b>
2.1 ORIGEN, DOMESTICACIÓN Y TAXONOMÍA DEL TOMATE .....	6
2.2 FAMILIA GEMINIVIRIDAE. MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA.....	8
2.3 GÉNERO BEGOMOVIRUS, CULTIVOS QUE AFECTA Y DISTRIBUCIÓN. ....	9
2.3.1 Organización genómica de los begomovirus. ....	12
2.3.2 Ciclo replicativo viral de los begomovirus. ....	14
2.4 LA MOSCA BLANCA (BEMISIA TABACI GEN.).....	15
2.4.1 Relación mosca blanca-begomovirus. ....	17
2.4.2 Métodos empleados para el control de la mosca blanca.....	19
2.5 MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL TOMATE PARA LA RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS.....	20
2.5.1 Fuentes de resistencia a begomovirus en <i>Solanum spp.</i> .....	22
2.6 IMPORTANCIA DE LOS MÉTODOS DE INOCULACIÓN VIRAL Y DE LAS HERRAMIENTAS MOLECULARES EN UN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TOMATE A BEGOMOVIRUS. ....	26
2.6.1 Métodos utilizados para la inoculación de begomovirus en tomate.....	26
2.6.2 Herramientas moleculares empleadas en el mejoramiento genético de tomate a begomovirus.....	28
2.7 TENDENCIAS Y PERSPECTIVAS DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO EN TOMATE PARA LA RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS. ....	30
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 ASPECTOS GENERALES. ....	33
3.1.1 Localidades y registro de variables climáticas.....	33
3.1.2 Material vegetal.....	33
3.1.3 Siembra y condiciones experimentales. ....	34
3.1.3.1 Área experimental del INCA.....	34
3.1.3.2 Área experimental de la Universidad Federal de Viçosa. ....	35
3.2 EVALUACIÓN DE CULTIVARES ANTE AISLADO DE BEGOMOVIRUS MONOPARTITO. ....	35
3.2.1 Cultivares inoculados con aislado cubano de TYLCV.....	35
3.2.1.1 Inoculación de los cultivares, por mosca blanca.....	36
3.2.1.2 Inoculación de los cultivares, por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....	37
3.2.1.3 Evaluación de la severidad de la enfermedad provocada por la infección de TYLCV-IL [CU].....	38
3.2.1.4 Concentración de ADN viral en las plantas inoculadas con TYLCV-IL [CU].....	38
3.3 EVALUACIÓN DE LA SEGREGACIÓN DE LA RESISTENCIA A TYLCV-IL [CU] CONFERIDA POR LOS GENES DE RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS <i>TY-1</i> Y <i>TY-2</i> .....	40
3.3.1 Incorporación de los genes de resistencia a begomovirus <i>Ty-1</i> y <i>Ty-2</i> , en el cultivar 'Amalia'. ....	40
3.3.1.1 Inoculación del TYLCV-IL [CU], en cultivares parentales y poblaciones segregantes para los genes de resistencia a begomovirus <i>Ty-1</i> y <i>Ty-2</i> . ....	40
3.3.1.2 Evaluación de la severidad y estimación de la concentración del ADN.....	41
3.4 EVALUACIÓN DE CULTIVARES ANTE AISLADOS DE BEGOMOVIRUS BIPARTITOS. ....	41
3.4.1 Cultivares inoculados con aislados brasileños de ToYSV y ToSRV.....	41
3.4.1.1 Inoculación de los cultivares, por biobalística. ....	41
3.4.1.2 Evaluación de la severidad de la enfermedad provocada por la infección de ToYSV y ToSRV.....	42
3.4.1.3 Concentración de ADN viral en las plantas inoculadas con ToYSV y ToSRV. ....	42
3.4.2 Evaluación de cultivares frente a begomovirus bipartitos, en condiciones de infección natural.....	44

3.5 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LOS GENES DE RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS TY-1, TY-2 Y TY-3 EN CULTIVARES DE TOMATE .....	45
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
4.1 EVALUACIÓN DE CULTIVARES ANTE AISLADO DE BEGOMOVIRUS MONOPARTITO. ....	48
4.1.1 Cultivares inoculados con TYLCV-IL [CU], por mosca blanca.....	48
4.1.2 Cultivares inoculados con TYLCV-IL [CU], por agroinoculación. ....	62
4.2 EVALUACIÓN DE LA SEGREGACIÓN DE LA RESISTENCIA A TYLCV-IL [CU] CONFERIDA POR LOS GENES DE RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS TY-1 Y TY-2.....	68
4.3 EVALUACIÓN DE CULTIVARES ANTE AISLADOS DE BEGOMOVIRUS BIPARTITOS. ....	73
4.3.1 Cultivares inoculados con aislados brasileños de ToYSV y ToSRV, por biobalística. ....	73
4.3.2 Evaluación de cultivares frente a begomovirus bipartitos, en condiciones de infección natural.....	83
4.4 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LOS GENES DE RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS TY-1, TY-2 Y TY-3 EN CULTIVARES DE TOMATE. ....	87
4.5 DISCUSIÓN GENERAL.....	94
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>100</b>

## SÍNTESIS

Los begomovirus son considerados uno de los principales patógenos de plantas que afectan el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Cuba. La resistencia genética constituye una alternativa viable para contrarrestar los efectos negativos que causa la enfermedad. Los objetivos de este trabajo han estado encaminados a la búsqueda de fuentes de resistencia a begomovirus mono y bipartitos, para su aprovechamiento e incorporación al programa de mejoramiento genético de esta hortaliza en el país. Doce cultivares de tomate, de resistencia conocida al *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) se evaluaron frente al aislado cubano (TYLCV-IL [CU]) y a los aislados brasileños de *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) y *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). A estos se les determinó la presencia de los genes *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3*, de resistencia a begomovirus, a través de marcadores moleculares de ADN. Las inoculaciones se realizaron, para TYLCV, mediante el vector natural, mosca blanca (*Bemisia tabaci* biotipo B) y el *Agrobacterium tumefaciens*; mientras que para ToYSV y ToSRV se empleó la biobalística y la libre elección en campo. Los cultivares ‘Vyta’, ‘L7’, ‘TX468-RG’, ‘STY4’ y ‘STY5’ resultaron resistentes frente a los tres begomovirus evaluados. Se identificaron dos cultivares con el gen *Ty-1* (‘TY52’ y ‘STY3’), dos con el gen *Ty-2* (‘H24’ y ‘L7’) y uno con el gen *Ty-3* (‘STY4’). ‘H24’ y ‘L7’ fueron inmunes a TYLCV-IL [CU], pues sus plantas no mostraron síntomas de la enfermedad ni replicación del virus. Se recomiendan progenitores para el programa de mejora a begomovirus y se discuten los resultados de la segregación de la resistencia en plantas F<sub>2</sub> del cruce de ‘Amalia’ x ‘H24’ y ‘Amalia’ x ‘TY52’. Se estableció la escala de severidad de la enfermedad como un criterio de selección fenotípico para incorporar la resistencia a TYLCV-IL [CU] en cultivares susceptibles, cuando no se dispone de facilidades para aplicar la selección asistida por marcadores para los genes *Ty-1* y *Ty-2*. El empleo de las herramientas moleculares evidenció su importancia en los trabajos de selección de progenitores y en el diagnóstico de los begomovirus. Los resultados alcanzados demostraron la existencia de nuevas fuentes de resistencia, lo cual permitirá reforzar la estrategia varietal y el programa de mejoramiento genético del cultivo en el país.

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

### Lista de abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNsc	ADN de cadena simple
ARN	ácido ribonucleico
AVRDC	Asian Vegetable Research and Development Center
CAPS	polimorfismo de las secuencias cortadas amplificadas del inglés “Cleaved amplified polymorphic sequence”
cM	centimorgan
COMAV	Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana
CP	proteína de la cápside, del inglés “Coat Protein”
CSPD	sustrato quimioluminiscente para la fosfatasa alcalina, del inglés “Chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase”
dpi	días post inoculación
dpt	días después del trasplante
EEC	elemento estructural conservado
EMBRAPA	Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
EPPO	Oficina para la protección de plantas de Europa, del inglés “Europea plants protection office”
gauge	Unidad de medida. Calibre o diámetro exterior de una aguja de inyección
g	gravedades
HAN	hibridación de ácidos nucleicos
HSP	proteínas de choque térmico, del inglés “ <i>Heat Shock Proteins</i> ”
IIHLD	Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”
INCA	Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
INTA	Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria
IR	región intergénica, del inglés “Intergenic Region”
Kb	kilopares de bases
min.	minutos
MLAs	marcos de lecturas abiertos
MP	proteína de movimiento, del inglés “Movement Protein”
nm	nanómetros
NSP	proteína transportadora nuclear, del inglés “Nuclear Shutter Protein”
nt	nucleótidos
pb	pares de bases de nucleótidos
QTL	loci/locus de caracteres cuantitativos, del inglés “Quantitative trait loci or locus”
RAPD	polimorfismo del ADN amplificado al azar, del inglés “Random amplified polymorphic DNA”
RCP	reacción en cadena de la polimerasa
REn	proteína potenciadora de la replicación, del inglés “Replication Enhancement”
Rep	proteína asociada a la replicación, del inglés “Replication-associated protein”
RF	forma replicativa, del inglés “Replicative form”
RFLP	polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, del inglés “Restriction fragment length polymorphism”
s	segundos

SCAR	regiones amplificadas caracterizadas por secuencias, del inglés “Sequence characterized amplified regions”
SSR	secuencias simples repetidas, del inglés “Simple sequence repeats”
Ti	inductor de tumores, del inglés Tumor Inducer”
TrAP	proteína transactivadora, del inglés “Trans-activator Protein”
TYLCD	Tomato yellow leaf curl virus diseases
UFV	Universidad Federal de Viçosa
UPV	Universidad Politécnica de Valencia
UV	ultra violeta

## Lista de acrónimos

Los nombres y acrónimos de los virus que a continuación se listan y que se emplean en el documento, se han conservado en la forma en la que están registrados por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, siglas en inglés) siguiendo las normas del ICTV (Fauquet y *col.*, 2008).

SiMMV	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>
TGMV	<i>Tomato golden mosaic virus</i>
ToCMoV	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>
ToCMV	<i>Tomato chlorotic mosaic virus</i>
ToCrV	<i>Tomato crinkle virus</i>
ToDLCV	<i>Tomato dwarf leaf curl virus</i>
ToIYV	<i>Tomato infectious yellows virus</i>
ToLCV	<i>Tomato leaf curl virus</i>
ToMHV	<i>Tomato mosaic Havana virus</i>
ToMoLCV	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>
ToMoTV	<i>Tomato mottle Taino virus</i>
ToMoV	<i>Tomato mottle virus</i>
ToRMV	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>
ToSLCV	<i>Tomato severe leaf curl virus</i>
ToSRV	<i>Tomato severe rugose virus</i>
ToYLDV	<i>Tomato yellow leaf distortion virus</i>
ToYMV	<i>Tomato yellow mosaic virus</i>
ToYSV	<i>Tomato yellow spot virus</i>
ToYVSV	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
TYLCV-IL	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> aislado de Israel
TYLCV-IL [CU]	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> aislado de Cuba
TYLCV-Mld [IL]	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> aislado suave de Israel
TYLCV-IL [TW]	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> aislado de Taiwán

# **I. INTRODUCCIÓN**

## I. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Peralta y col., 2006), es la segunda especie en importancia dentro del género *Solanum* spp., por su papel en los hábitos alimenticios de una amplia parte de la población mundial (Foolad, 2007; Díez y Nuez, 2008) y una de las principales hortalizas que se cultiva en Cuba, con un rendimiento promedio de 13,5 t.ha<sup>-1</sup> (FAOSTAT, 2011). Estos bajos rendimientos, al igual que los de la gran mayoría de los países tropicales, se deben al efecto negativo que ejercen los factores climáticos y la alta incidencia de plagas en el cultivo (Morales, 2010).

Entre las principales plagas que afectan al tomate y que ocasionan pérdidas en el rendimiento, de hasta un 100%, están los comúnmente denominados “geminivirus” (Navas y col., 2011). La familia *Geminiviridae* constituye una de las cuatro familias de virus que infectan vegetales, con ADN como material genético. Entre los géneros que la conforman, el que más afectaciones provoca es el *Begomovirus*, transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Genn.) (Moriones y Navas, 2000; Ribeiro y col., 2003; García y col., 2004; Tsai y col., 2011).

Hasta el presente, el complejo mosca blanca-geminivirus ha sido considerado, en la mayoría de los países tropicales y subtropicales, como el principal problema fitosanitario que azota a diferentes cultivos hortícolas (Morales, 2010; Navas y col., 2011). En Cuba, las primeras evidencias de síntomas asociados a begomovirus, en plantaciones de tomate, se manifestaron a finales de la década de los 80 (Gómez y González, 1993), lo cual coincidió con un aumento de las poblaciones del insecto vector, presentándose durante los años 1991-1992, entre un 30 y 42% de afectación en las áreas cultivadas de todo el país (Murguido y Elisondo 2007). A inicios de la década de los 90, se desarrolló un programa de Manejo Integrado de Plagas (MIP) y diversos proyectos de investigación encaminados a la identificación, caracterización y obtención de métodos de diagnóstico para la detección del agente causal.

Como resultado de los mismos se identificaron, en el país, tres begomovirus en el tomate: el monopartito *Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV-IL [CU] (Martínez y col., 1996; Fauquet y col., 2008), y los bipartitos *Tomato mottle Taino virus* (ToMoTV) y

*Tomato mosaic Havana virus* (ToMHV) (Ramos y col., 1997; Martínez y col., 1998), los cuales son menos agresivos y han sido desplazados por TYLCV-IL [CU], en condiciones de infección natural (Martínez y col., 2003).

Una vez identificados los agentes causales, se inició un programa de mejora genética para la obtención de materiales híbridos (Piñón y Gómez, 2003), líneas y variedades (Gómez y col., 2004) resistentes ante los efectos negativos provocados por TYLCV-IL [CU]. Se introgresó el gen *Ty-1* (Piñón y col., 2005), a partir de la accesión LA 1969 de *Solanum chilense* (Dunal) Reiche., y fueron obtenidas líneas homocigóticas resistentes a begomovirus, adaptadas a las condiciones edafoclimáticas cubanas, culminando con la obtención y generalización del cultivar 'Vyta', para su explotación comercial en todas las áreas productoras del país (Gómez y col., 2004).

Existen evidencias de la aparición de nuevos begomovirus en los campos de producción de tomate en Cuba. Fiallo y col. (2009; 2012a) determinaron la presencia de una nueva especie con genoma bipartito infectando tomate (*Tomato yellow leaf distortion virus*, ToYLDV). Aunque se reconoce la prevalencia de TYLCV-IL [CU] en el país (Martínez y col., 1996-2009), también se han descrito otras especies de begomovirus que infectan arvenses asociadas con el cultivo (Fiallo y col., 2010a, b; 2012b), lo cual es un elemento agravante a tener en cuenta en la epidemiología de las enfermedades causadas por los miembros del género *Begomovirus* y que puede originar nuevas variantes virales con características biológicas diferentes y mejor adaptadas (García y col., 2006), capaces de romper la resistencia genética del cultivar en explotación con mucha mayor facilidad si la misma es monogénica o vertical.

La utilización de cultivares resistentes, combinado con la lucha biológica en la estrategia del Manejo Integrado de Plagas, podría contribuir a reducir los porcentajes de plantas infectadas y, consecuentemente, la incidencia de la enfermedad (Stansley y col., 2004). En este sentido, la identificación de nuevas fuentes de resistencia al patógeno y su incorporación en cultivares comerciales, son investigaciones que merecen ser priorizadas (Lourenção y col., 2004).

La búsqueda de estas nuevas fuentes se hace posible, gracias a los avances logrados a nivel internacional en la introgresión de genes de resistencia desde especies silvestres hacia el tomate; como *Ty-1* (Zamir y col., 1994), *Ty-2* (Hanson y col., 2006), *Ty-3* (Ji y col., 2007a), *tcm-1* (Giordano y col., 2005a), *tgr-1* (Bian y col., 2007), poligenes y, últimamente, los genes *Ty-4* (Ji y col., 2009a) y *Ty-5* (Anbinder y col., 2009); provenientes de *S. peruvianum* L., *S. chilense* (Dunal) Reiche, *S. habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner, *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg y *S. pimpinellifolium* L. De este genofondo, las fuentes de resistencias más explotadas han sido aquellas provenientes de *S. chilense*, *S. peruvianum* y *S. habrochaites* (Vidavsky y col., 2008).

Teniendo en cuenta las tendencias actuales del mejoramiento genético para la enfermedad y al contar en Cuba con un solo cultivar resistente a begomovirus portador del gen *Ty-1* (Piñón, 2009), se impone la necesidad de identificar nuevos materiales con genes y mecanismos de resistencia diferentes a los de ‘Vyta’, que puedan ser aprovechados por el programa de mejoramiento genético del cultivo, en el posterior desarrollo de híbridos, líneas y cultivares comerciales con una resistencia más duradera.

Identificar resistencias de amplio espectro frente a diversos begomovirus, basadas en diferentes genes y mecanismos e incorporarlas a cultivares permitiría trazar estrategias de una mayor durabilidad ante la amenaza de aparición de mutantes del virus, recombinaciones entre especies virales y emergencias de nuevas especies.

Actualmente, la proyección estratégica del Programa Integral de Cultivos Varios del Ministerio de la Agricultura de Cuba contempla entre sus acciones la obtención e introducción de nuevos cultivares con resistencia a begomovirus y otras enfermedades de importancia económica (Pérez, 2010), con la finalidad de disminuir las pérdidas en la producción de esta importante hortaliza para el país.

Es por ello que, a partir del aprovechamiento de fuentes naturales de resistencia y considerando la elevada incidencia y prevalencia de begomovirus en el país, se propuso la siguiente hipótesis de trabajo: **a partir de cultivares de tomate con resistencia a *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), de diversa procedencia genética, es posible identificar otras fuentes de resistencia al aislado cubano de TYLCV y a los**

**begomovirus bipartitos *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) y *Tomato severe rugose virus* (ToSRV).**

Para aceptar o refutar esta hipótesis se planteó el siguiente objetivo general: **identificar e incorporar al programa de mejora del tomate en Cuba, otras fuentes de resistencia a begomovirus que afectan al cultivo.**

Los objetivos específicos propuestos para cumplimentar el objetivo general fueron los siguientes:

- Evaluar el comportamiento de cultivares de tomate resistentes a begomovirus, de diversa procedencia genética, ante la infección por TYLCV-IL [CU], mediada por mosca blanca y *Agrobacterium tumefaciens*.
- Evaluar la segregación de la resistencia a TYLCV-IL [CU] conferida por los genes de resistencia a begomovirus *Ty-1* y *Ty-2*.
- Identificar aquellos cultivares con resistencia a begomovirus que, además de ser resistentes a TYLCV-IL [CU], lo sean a begomovirus bipartitos, como ToYSV y ToSRV.
- Determinar, por marcadores de ADN, la presencia de los genes de resistencia a begomovirus *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3*, en los cultivares evaluados.

**Novedad Científica:**

Se identificaron nuevas fuentes de resistencia a TYLCV-IL [CU], dos de ellas con el gen de resistencia a begomovirus *Ty-2*, procedentes de *S. habrochaites*, con ausencia de síntomas de la enfermedad e inhibición total de la replicación viral, constituyendo el primer informe de inmunidad natural frente a este aislado en Cuba. Asimismo, se identificaron cultivares con resistencia a tres begomovirus: TYLCV-IL [CU] (monopartito), ToYSV y ToSRV (bipartitos), cuya resistencia procede de *S. habrochaites*, *S. chilense* y *S. peruvianum*.

**Importancia teórica:**

Se amplía el conocimiento de las bases teóricas para la resistencia a begomovirus y se demuestra el potencial de los diferentes genes involucrados en ella. Se evidencia que la inmunidad natural a TYLCV-IL [CU] podría estar conferida por el gen *Ty-2*, probablemente relacionado con mecanismos que inactivan los procesos de replicación viral o del movimiento célula a célula. Se aportan elementos que relacionan la resistencia asociada al gen *Ty-3*, con los eventos del tropismo viral, ya que, si bien se detecta la presencia de virus durante las diferentes etapas del muestreo en el cultivar que porta este gen de resistencia, sus concentraciones son notablemente inferiores a las registradas en los controles susceptibles. Se muestran evidencias de que la resistencia a los begomovirus bipartitos estudiados, presente en dos cultivares con los marcadores de los genes *Ty-1* y *Ty-2*, fue debida a la posible presencia de otro(s) gene(s) de resistencia, con diferentes mecanismos, que no fueron detectados por los marcadores empleados.

**Importancia práctica:**

Se identificaron cultivares de tomate resistentes a TYLCV-IL [CU], ToYSV y ToSRV (begomovirus mono y bipartitos), los que se recomiendan como progenitores a utilizar por el programa de mejoramiento genético para resistencia a begomovirus del cultivo, dada la factibilidad de manejar estos fitopatógenos y por ende, proteger a las plantaciones de tomate, con una resistencia más duradera. Se determinó, por marcadores de ADN, la presencia de los genes de resistencia a begomovirus *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3*, en algunos de los cultivares evaluados, lo cual permitirá implementar la selección asistida, en lugar de la selección fenotípica por la enfermedad. Ello implica un salto cualitativo y cuantitativo para el programa de fitomejoramiento de la especie, que va en favor del aprovechamiento de los recursos fitogenéticos y en pos de una agricultura más “amigable” con el agroecosistema. Estos resultados podrían ser también de importancia para los países de la región del Caribe, los cuales presentan en la actualidad serios problemas fitosanitarios causados por TYLCV.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Origen, domesticación y taxonomía del tomate.

El origen de la sección *Lycopersicon* del género *Solanum* se localiza en las zonas montañosas de los Andes que comprenden a Perú, Ecuador y Chile (a excepción de las subespecies *S. cheesmaniae* y *S. galagense*, las cuales son endémicas de las Islas Galápagos). Las mismas, abarcan una gran diversidad de ambientes en los que se desarrollan las especies silvestres, las cuales presentan una fuente importante de variabilidad y reservorio de genes con características interesantes, disponibles para la mejora del tomate cultivado (Darwin y col., 2003). Hay cierta controversia en relación con el lugar donde se produjo la domesticación de esta especie. Así Candolle (1983) señaló Perú como la zona donde presumiblemente se habría domesticado, sin embargo otros datos indicaron que, al parecer, este proceso partió de los cultivares primitivos y las líneas de *Solanum lycopersicum* variedad *cerasiforme* de México y Centroamérica, hecho que se apoya en estudios genéticos basados en la variabilidad isoenzimática y molecular, según informes de Causse y col. (2000), Quirós (2001) y Peralta y col. (2006).

La difusión del tomate en el Viejo Mundo transcurrió en el siglo XVI, acompañada de creencias infundadas sobre su toxicidad, pero la capacidad adaptativa de la planta a una amplia gama de condiciones climáticas y edáficas, así como las propiedades del fruto (color, aroma y aptitud para la conserva), entre otras múltiples razones, contribuyeron a su expansión, alcanzando una variedad de tipos muy extensa en cuanto a aspecto exterior (forma, tamaño, color) e interior (sabor, textura y dureza) (Nuez, 1995; Causse y col., 2000). Esta gran diversidad fenotípica no se correlaciona con la diversidad genética, que es escasa. Se cree que en los primeros pasos de la domesticación se produjeron grandes reducciones poblacionales que disminuyeron la variabilidad genética (Nuez, 1995).

El tomate es un miembro de la familia *Solanaceae*. Inicialmente fue incluido por Linneaus en el género *Solanum*; sin embargo hasta el año 2005, se adoptó la

clasificación propuesta por Miller desde 1754, en el género *Lycopersicon* (Peralta y col., 2006).

Recientemente, el uso de técnicas moleculares reveló que los géneros *Solanum* y *Lycopersicon* son muy parecidos. El género *Lycopersicon* ha cambiado de categoría taxonómica y se incluyó en la sección *Lycopersicon* dentro del género *Solanum*. Este género alberga 13 especies que pueden ser agrupadas en dos complejos de acuerdo con las barreras de cruzamiento con la especie cultivada *S. lycopersicum*: el complejo *Esculentum* y el complejo *Peruvianum* (Peralta y Spooner, 2005; Peralta y col., 2006). La relación de las especies de este grupo en *Solanum* y su correspondencia con la nomenclatura en *Lycopersicon* se indican en la tabla 1.

**Tabla 1.** Lista de especies del género *Solanum*, sección *Lycopersicon*. Se proporciona la procedencia con la nomenclatura previa. (Tomado de Peralta y col., 2006).

Nombre en <i>Solanum</i>	Equivalente en <i>Lycopersicon</i>
<i>S. arcanum</i> Peralta	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>L. chilense</i> Dunal
<i>S. chesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>L. chesmaniae</i> L. Riley (publicado incorrectamente como <i>cheesmanii</i> )
<i>S. chmielewskii</i> (C.M.Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>L. chielewskii</i> C.M Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle
<i>S. corneliomulleri</i> J.F. Macbr.	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller; conocido como <i>L. glandulosum</i> C.F. Mull.
<i>S. galapagense</i> S. Darwin & Peralta	Parte de <i>L. chesmaniae</i> L. Riley (reconocido previamente como forma o variedad <i>minor</i> )
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D.M. Spooner	<i>L. hirsutum</i> Dunal
<i>S. huaylasense</i> Peralta	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. lycopersicum</i> L.	<i>L. esculentum</i> Miller
<i>S. neorickii</i> (C.M.Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>L. parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle
<i>S. pennelli</i> Correll	<i>L. pennelli</i> (Correll) D'Arcy
<i>S. peruvianum</i> L.	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	<i>L. pimpinellifolium</i> (L.) Miller

El tomate es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia comercial en el mundo y el segundo dentro del género, debido a su papel fundamental en los hábitos alimenticios de una amplia parte de la población mundial, tanto por su consumo fresco como procesado (Foolad, 2007; Díez y Nuez, 2008).

En Cuba, este vegetal ocupa el 42% del área destinada al cultivo, con un nivel de producción de 750 000 toneladas y rendimiento promedio de 13,5 t.ha<sup>-1</sup>. Comparado con el resto de los países del Caribe, Cuba se ubica en el primer lugar en superficie

cosechada y producción total obtenida y en el décimo por su rendimiento promedio (FAOSTAT, 2011). Sin embargo, al igual que en la gran mayoría de los países tropicales del planeta, las producciones continúan siendo bajas debido al efecto negativo que ejercen los factores climáticos y la incidencia de plagas en el cultivo (Morales, 2010).

Esta hortaliza presenta susceptibilidad a una serie de factores bióticos que influyen en los rendimientos de las regiones donde es cultivada, lo cual ha estado favorecido por el proceso de domesticación a que se ha sometido a lo largo de los años (Nuez, 1995). Se informa su susceptibilidad a más de 200 fitopatógenos de origen fúngico, bacteriano y viral (Foolad, 2007).

Las especies virales dentro del género *Begomovirus* se encuentran, actualmente, entre las que más daños provocan en el cultivo, considerándose una limitante en la producción del tomate para el país (Gómez y col., 2004) y los grandes productores del mundo (Seal y col., 2006).

## **2.2 Familia *Geminiviridae*. Morfología y taxonomía.**

Algunas especies de virus pertenecientes a la familia *Geminiviridae* son responsables de pérdidas económicas en el cultivo en todo el planeta. El aumento mundial de la población y distribución del insecto vector *Bemisia tabaci* Gen. facilita el surgimiento de nuevas enfermedades, limitando la producción agrícola, particularmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rojas y col., 2005; Akos y Ervin, 2010; Pradeep y Masato, 2010).

La familia *Geminiviridae*, considerada una de las más numerosas dentro de los virus de plantas, comprende un grupo de virus con gran importancia para todos los continentes, debido a las afectaciones que provocan en numerosas familias vegetales de interés económico y alimenticio en varios países (*Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Poaceae*, *Asteraceae*, *Malvaceae*, etc.) (Calegario y col., 2007; Anfoka y col., 2009).

Los síntomas que se producen pueden variar de una a otra planta, atendiendo a las especies hospedantes y a la edad fisiológica en la que ocurre la infección. Los síntomas característicos de la infección por begomovirus pueden consistir en decoloración foliar (rayados o moteados, amarilleamientos o dorados con patrones de mosaicos), enanismo,

epinastías, enrollamiento o encrespamiento foliar, reducción del área foliar, abscisión floral y reducción del tamaño de los frutos, entre otros (Navas y *col.*, 2011).

Esta familia presenta un grado elevado de diversidad genética, dada la ocurrencia de eventos frecuentes de recombinación y pseudo-recombinación, que han contribuido a la tasa elevada de evolución molecular y, por ende, a su gran diversidad. La frecuencia con la que ocurre la recombinación puede ser impulsada por tres factores: las infecciones mixtas, los niveles elevados de replicación y la amplia gama de hospedantes del insecto vector (Navas y *col.*, 2011).

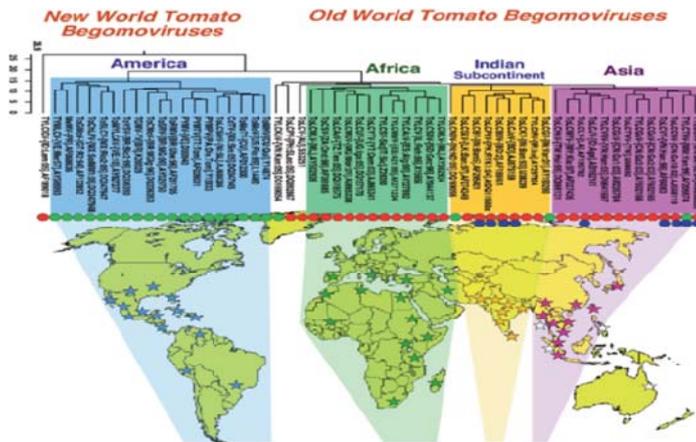
Su genoma está constituido por una o dos moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico) monocatenario y circular, de un tamaño entre 2,5 y 3,0 Kb. En condiciones naturales estos virus se transmiten por insectos, siendo el tipo de insecto que lo transmite, la organización del genoma y la gama de hospedantes las características empleadas para definir los cuatro géneros que conforman la familia (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*) (Fauquet y *col.*, 2008).

### **2.3 Género *Begomovirus*, cultivos que afecta y distribución.**

El género *Begomovirus*, es de los más importantes dentro de la familia *Geminiviridae*, pues cuenta con un gran número de especies virales y un número mayor de especies hospedantes. Los begomovirus son considerados un grupo de virus emergentes que, a lo largo de la última década, han causado pérdidas y daños considerables debido a su alta incidencia y severidad en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Were y *col.*, 2004; Cuéllar y Morales, 2006) (Fig. 1).

A nivel internacional las especies de este género son consideradas las de mayor incidencia en el cultivo del tomate habiendo sido descritas más de 80 (Fauquet y *col.*, 2008). Las mismas provocan, además, pérdidas considerables en otros cultivos de importancia económica y alimenticia, como son: frijol caupí (*Vigna unguiculata*), frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), algodón (*Gossypium barbadense* L.), yuca (*Manihot esculenta* Cranz.), papa (*Solanum tuberosum* L.), boniato (*Ipomea batata* L.), soya (*Glycine max* (L.) Murray.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), pepino (*Cucumis sativus*

L.), calabaza (*Cucurbita pepo* L.), melón (*Cucumis melo* L.), pimiento (*Capsicum* spp.), etc. (Cuéllar y Morales, 2000; Morales, 2010).



**Figura 1.** Distribución continental de begomovirus del Viejo y el Nuevo Mundo descritos en *Solanum lycopersicum* L. (Fuente: Abhary y col. (2007).

La mayoría de los begomovirus están constituidos por dos componentes genómicos ADN-A y ADN-B (begomovirus bipartitos). No obstante, algunos de los begomovirus del Viejo Mundo, como *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), tienen apenas un componente genómico, el ADN-A (begomovirus monopartito) (Stanley y col., 2005).

En el continente americano prevalecen, generalmente, los begomovirus con genomas bipartitos, con tamaños que varían entre los 2,5 a 2,8 Kb, aunque se ha informado sobre la incidencia de begomovirus del Viejo Mundo en la mayoría de los países de la cuenca del Caribe (Polston y col., 1999 y Martínez y col., 2004), sur de los Estados Unidos (Brown, 2007) y en algunas regiones del oeste norteamericano (Sinaloa, México y California), indicando las múltiples introducciones de los virus del Viejo Mundo en el continente (Duffy y Holmes, 2007).

Los primeros informes de begomovirus afectando tomate, en el continente americano, ocurrieron en Brasil en el año 1950 (Flores y col., 1960; Flores y Silberschmidt, 1967).

Maytis y col. (1975) observaron partículas gemelas que caracterizaron y denominaron a este virus como *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Su comportamiento endémico no le permitió causar daños de importancia económica para el cultivo, situación que se revirtió con la aparición del biotipo B de *B. tabaci* en las regiones productoras del país,

en la década de los 90. Desde inicios de la misma, ocho nuevas especies de begomovirus fueron descritas infectando el tomate en el país: *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato crinkle virus* (ToCrV), *Tomato infectious yellows virus* (ToIYV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) y *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), algunas de estas presentes en varias regiones del país y otras restringidas a determinadas localidades (Ambrozevicius y col., 2002; Andrade y col., 2002; Faria y col., 1997, 2000; Ribeiro y col., 2003; Fernandes y col., 2006, 2008). Hasta el presente, en Brasil, se han descrito 14 especies de begomovirus en tomate (Fauquet y col., 2008).

Un segundo informe de begomovirus fue efectuado en Venezuela en el año 1963 en los estados productores de Aragua, Carabobo, Guarico y Lara (Lastra y Uzcategui 1975; Lastra y Gil 1981). Años más tardes, el *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV) se dispersó y convirtió en una de las principales especies virales que afectó la producción de tomate en países de las regiones de América del Sur (Panamá y Colombia) (Engel y col., 1998; Morales, 2006) y del Caribe (Guadalupe, Martinica, Trinidad y Tobago, Puerto Rico y República Dominicana) (Polston y col., 1998; Urbino y col., 2004).

América Central también ha sido un punto de origen para muchos de los begomovirus que infectan actualmente tomate (Polston y Anderson, 1997). Los países más afectados han sido Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá. Entre las especies virales que más influyen sobre los rendimientos en el cultivo pueden mencionarse *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV) (Rojas, 2005), *Tomato mottle virus* (ToMoV) y *Tomato mosaic Havana virus* (ToMHV) (Morales, 2010).

En el Caribe, la mayor importancia de los begomovirus estuvo dada por las grandes afectaciones que ocurrieron en las áreas productoras de tomate en República Dominicana, a partir de la introducción del más importante y devastador de los begomovirus del Viejo Mundo, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), el cual colapsó la industria tomatara en este país y Haití (Morales y Anderson, 2001; Morales, 2006). TYLCV continuó su dispersión por el Caribe afectando a otros países de la región como: Jamaica, Belice, Saint Kitts y Nevis, Puerto Rico, Guadalupe, Martinica, Haití, Antigua

y Barbuda (Morales, 2010), así como en la región del Sur de los Estados Unidos, México, Venezuela y Guatemala (Navas y col., 2011).

En Cuba, las enfermedades producidas por begomovirus se detectaron a partir del año 1987 (González, 1995), y su aparición se asoció al aumento de las poblaciones de mosca blanca en cultivos de importancia económica, así como en diferentes especies de arvenses (Cordero y col., 2003; Domínguez y col., 2002; Echemendía y col., 2001, 2003, 2004; Ramos y col., 2002). En la década del 90 del siglo XX, la incidencia alta de la enfermedad del encrespamiento y amarilleamiento de la hoja del tomate ocasionó la pérdida de campos completos de este cultivo y la proscripción de cultivares de tomate susceptibles. Entre ellos, se destacó ‘Campbell 28’, que llegó a ocupar el 50% del territorio destinado a ese cultivo en Cuba debido a su versatilidad de empleo para el procesamiento industrial y para el consumo como fruta fresca (Gómez y col., 2004).

Hacia mediados de los años 90 estudios moleculares demostraron que el TYLCV era el agente causal de la epifítia. Este aislado presentó un 98% de homología con el de Israel (Martínez y col., 1996; Ramos y col., 1996) el que más tarde Fauquet y col., (2008) designaron como TYLCV-IL [CU]. Un año después, otros dos begomovirus fueron identificados en campos de tomate: ToMHV (*Tomato mosaic Havana virus*) (Martínez y col., 1997) y ToMoTV (*Tomato mottle Taino virus*) (Ramos y col., 1997). Prospecciones desarrolladas por Fiallo y col. (2009; 2012a) en diferentes regiones del país, determinaron la presencia de un nuevo begomovirus de genoma bipartito infectando tomate (*Tomato yellow leaf distortion virus*, ToYLDV), elemento a tener en cuenta en la epidemiología de las enfermedades causadas por los miembros de este género.

Sin embargo, TYLCV-IL [CU] es el principal begomovirus que prevalece en las áreas productoras del país (Martínez, 2009), siendo la causa fundamental de la disminución del rendimiento en las cosechas de tomate cuando se utilizan cultivares susceptibles (Gómez y col., 2004).

### **2.3.1 Organización genómica de los begomovirus.**

El ADN-A y ADN-B, de los begomovirus bipartitos, son transcritos bidireccionalmente. El ADN-A codifica todas las proteínas necesarias para la replicación, transcripción y

encapsidación de ambos genomas (A y B), mientras el ADN-B contribuye con las funciones necesarias para el movimiento del virus en la planta y el desarrollo de síntomas (Rojas y *col.*, 2005). El componente A codifica para la proteína de la cápside CP (*AVI*) en el sentido viral y cuatro proteínas en el sentido complementario: Rep (*AC1*), TrAP (*AC2*), REn (*AC3*) y AC4. El genoma B codifica para dos proteínas, una en el sentido de la replicación viral, la NSP (*BVI*) y otra en el sentido complementario, la MP (*BC1*).

Ambos componentes genómicos poseen un tamaño parecido, con una similitud de secuencias entre ambos genomas muy baja, excepto para la región intergénica (IR), que incluye la estructura en horquilla que comprende al nanonucleótido conservado en todos los begomovirus, sitio donde está localizado el origen de replicación (Zhou y *col.*, 2003; Gutiérrez y *col.*, 2004; Stanley, 2004; Yadava y *col.*, 2010). Generalmente, ambos componentes genómicos son necesarios para la infección sistémica, aunque se demostró, experimentalmente, que con solamente el componente A de *Tomato chlorotic mosaic virus* (ToCMV), se logra una infección sistémica en tomate y otras plantas hospedantes, (Fontenelle y *col.*, 2007).

Algunas especies de begomovirus presentan genomas monopartitos, el cual posee los genes necesarios para desempeñar todas las funciones esenciales del virus, sean aquellas relacionadas con la replicación y el movimiento viral célula-célula y a larga distancia. Estos begomovirus difieren en números de MLAs, en relación con los presentes en los del ADN-A de los que presentan genomas bipartitos (Gronenborn, 2007; Yadava y *col.*, 2010).

Las especies monopartitas presentan un genoma circular de ADN de cadena simple de aproximadamente 2,8 Kb. Esta molécula codifica seis proteínas, dos en el sentido viral y cuatro en el antiviral, cuyos MLAs se solapan entre sí y se organizan en forma bidireccional en dos unidades de transcripción separadas por una región intergénica (IR) no codificante de aproximadamente 300 nt (Rybicki y *col.*, 2000).

Algunos de los begomovirus monopartitos están asociados a una molécula de ADN satélite de 1,3 Kb, que se denomina componente ADN  $\beta$  (Khan y *col.*, 2008; Yadava y

*col.*, 2010). Estos ADN  $\beta$  dependen del virus que lo mantiene para su replicación, encapsidación, transmisión y movimiento en la planta, razón por la cual reciben el nombre de ADNs satélites (Mayo y *col.*, 2005).

### **2.3.2 Ciclo replicativo viral de los begomovirus.**

La replicación de los begomovirus ocurre en el núcleo de las células infectadas, dependiendo en gran medida de la maquinaria del hospedante. El genoma circular de cadena simple de ADN (ADNsc) es replicado por medio de un intermediario de cadena doble, denominado forma replicativa o RF, utilizando el mecanismo de círculo rodante semejante al utilizado por los bacteriófagos. La RF sirve como molde para la síntesis de nuevos componentes genómicos y también para la transcripción de los genes virales (Jeske, 2007; Yadava y *col.*, 2010).

El origen de replicación (*ori*) está localizado en la región intergénica. La secuencia de *ori* es conservada y puede ser variable entre las especies de begomovirus, con excepción de una región de aproximadamente 30 nt conservada entre todas las especies (Lazarowits, 1992; Gutiérrez y *col.*, 2004; Yadava y *col.*, 2010). En esta última se localiza una secuencia repetida e invertida compuesta, principalmente, por las bases nitrogenadas guanina y citosina, formando un elemento estructural conservado (EEC) en forma de horquilla, con una secuencia invariable (5'-TAATATTAC-3') presente en todos los begomovirus, que constituye el dominio funcional del origen de replicación (Orozco y Hanley, 2000). Es en esta región donde ocurre el clivaje que inicia el proceso de replicación por círculo rodante (Laufs y *col.*, 1995; Jeske, 2007).

El clivaje es realizado por la proteína Rep, que actúa como una endonucleasa sitio-específica con requerimientos de estructura y secuencias (Orozco y Hanley, 2000; Gronenborn, 2007). En esta región común se localizan, también, secuencias específicas para la unión de la proteína Rep (Fontes y *col.*, 1994) y regiones promotoras de la ARN polimerasa tipo II de plantas, responsable por la transcripción de los genes virales (Hanley y *col.*, 2000).

El sitio de unión de Rep al ADN viral está localizado entre la caja TATA del gen *rep* y el EEC (Orozco y *col.*, 1998) y está constituido por dos secuencias idénticas repetidas,

denominadas “iterons”. La unión de la Rep a los iterones es esencial para el inicio de la replicación. Después de la unión de Rep al ADN viral y la estabilización del complejo formado por Rep, Ren y factores del hospedante, la proteína Rep corta el nanonucleótido localizado en el EEC, dando inicio a la replicación por círculo rodante (Laufs y *col.*, 1995; Jeske, 2007). El reconocimiento de los iterones por la Rep es considerado virus-específico (Argüello y *col.*, 1994; Argüello y Ruiz, 2001; Ramos y *col.*, 2003).

#### **2.4 La mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gen.).**

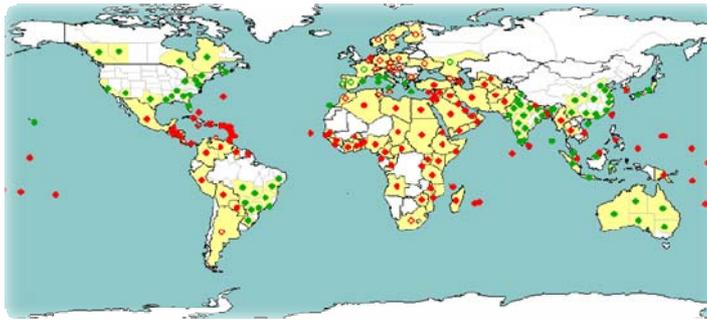
La mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: *Aleyrodidae*) fue descrita por primera vez en 1889 en Grecia (Gennadius, 1889) y había sido informada en diferentes regiones con otros nombres hasta que Mound (1963), comprobó que las características morfológicas de la pupa, que son las utilizadas para los estudios taxonómicos, variaban según la morfología de la superficie de la hoja de sus plantas hospedantes, por lo que muchas de las especies antes descritas se convirtieron en sinónimos de *B. tabaci* (Mound, 1963; Bellow y *col.*, 1994).

*Bemisia tabaci* presenta alta variabilidad biológica intraespecífica y genética, considerándose un complejo de especies y se reconocen 41 biotipos (Bosco y *col.*, 2006). El biotipo B presenta mayor gama de hospedantes, fecundidad y capacidad de dispersión, con respecto al biotipo A. Es altamente polífago, incidiendo en más de 600 plantas hospedantes de 74 familias botánicas diferentes, siendo las arvenses las que ocupan un papel importante en el mantenimiento de las poblaciones de *Bemisia*, así como de diferentes especies virales (Morales y *col.*, 2006).

El insecto se alimenta de la savia de las plantas, causando daños directos e indirectos mediante la succión de la savia y la secreción azucarada, en su fase larval, lo cual favorece el crecimiento y expansión de un complejo de hongos denominado fumagina. Este último reduce la capacidad fotosintética de la planta y por consiguiente, los rendimientos (Jones, 2003; Morales y *col.*, 2003; Baldin y *col.*, 2005; Cuéllar y Morales, 2006).

La importancia, distribución e incidencia de los begomovirus está directamente asociada con la distribución y dinámica poblacional de *B. tabaci* (Morales, 2006; Brown, 2007).

Esta especie ha sido informada en regiones tropicales y subtropicales; se encuentra distribuida en el sur de Europa, África, India, Australia, América Latina y el Caribe y en las islas del suroeste del océano Índico (Delatte, 2005; Brown, 2007; Mc Auslane, 2007) (Fig. 2).



**Figura 2.** Distribución, a nivel mundial, del biotipo B de *Bemisia tabaci* Gen. (Fuente: EPPO (2005)). Puntos verdes y rojos indican que están presentes con record nacional (rojos) y record local (verdes). Puntos rojos y verdes, sin rellenos, indican que solo están presentes en algunas áreas con el mismo estatus de record establecido para los anteriores.

En América Latina, las moscas blancas se convirtieron en plagas de importancia económica alrededor de la década de los 1970s, debido al uso intensivo de productos químicos (disponibles después de la segunda guerra mundial), en cultivos comerciales como el algodón. El uso de insecticidas no selectivos eliminó los enemigos naturales de la mosca y creó resistencia en estas plagas a los insecticidas tradicionales. Adicionalmente, los cambios climáticos (sequías y calentamientos) y un mayor intercambio internacional de material vegetal, han facilitado su desarrollo y diseminación, respectivamente (Morales y col., 2006; Morales, 2010; Navas y col., 2011).

Los biotipos más difundidos son el A, originalmente en América, el B, en la región comprendida por el noreste de África-Medio Este-Península Arábiga (Frohlich y col., 1999) y Q, localizado en la cuenca del mar Mediterráneo (Marín, 2004); China (Chu y col., 2001); Japón (Ueda y Brown, 2006); México, Estados Unidos, Guatemala (Brown, 2007) y Nueva Zelanda (Scott y col., 2007). En la década del noventa, el biotipo B llegó al continente americano y se diseminó rápidamente, lo cual favoreció el desarrollo de nuevos problemas con begomovirus previamente desconocidos (Morales y Anderson, 2001; Varma y Malathi, 2003; Morales, 2010; Navas y col., 2011).

La presencia de esta plaga en Cuba, fue notificada por Brown en 1945 (Viscarret y col., 2003). Fue nombrada en sus inicios como *Bemisia tabaci*, y posteriormente se le conoció

como el biotipo A de esta especie (Perring y *col.*, 1993). La misma causó serios estragos, principalmente durante las campañas de 1989-1993, en los cultivos de tomate y frijol, por lo que se comenzaron estudios relacionados con el virus, el vector y la interacción virus-vector. En 1995 se informó la presencia del biotipo B de *B. tabaci*, junto al biotipo nativo A, sobre un elevado número de hospedantes (Vázquez, 1995). Años más tarde, utilizando marcadores RAPD, se encontró solo el Biotipo B de *B. tabaci* en plantaciones de tomate examinadas en la provincia de La Habana (Hernández, 2001) y en nueve provincias muestreadas de todo el país con marcadores microsatélites y secuenciación del gen de la citocromo oxidasa I mitocondrial (Muñiz y *col.*, 2006). Resultados obtenidos por Peterschmitt (2007) describieron la dominancia de las poblaciones del biotipo B de mosca blanca en el Caribe, comparado con las poblaciones indígenas del insecto.

#### **2.4.1 Relación mosca blanca-begomovirus.**

En la actualidad, las relaciones que se establecen entre los virus con los insectos vectores pueden ser clasificadas en no persistente, semi-persistente, persistente circulativa y persistente propagativa, siendo la transmisión de begomovirus por la mosca blanca del tipo, persistente circulativa (el insecto vector adquiere el virus y puede retenerlo por largos períodos de tiempo, durante la vida del vector, circulando sin replicarse en él) (Hogenhout y *col.*, 2008).

La mosca blanca se alimenta del floema de las plantas. Introduciendo el estilete extrae aminoácidos y carbohidratos necesarios para su supervivencia. Al mismo tiempo, el insecto adquiere el virus y este circula en su cuerpo hasta las glándulas salivares, el cual pasa a una nueva planta cuando se alimenta (Lacerda y Carvalho, 2008; Czepak y *col.*, 2009). La proteína de la cápside es esencial para la adquisición del virión por el insecto vector y determina la especificidad con el aparato picador-chupador de la mosca (Gronenborn, 2007).

De manera general, las relaciones que se establecen entre especies de *Begomovirus* y *Bemisia tabaci* han sido ampliamente estudiadas, siendo muchas de estas relaciones algo complejas, pudiendo existir o no replicación del virus en el insecto vector, transmisión

transovárica del virus hasta la progenie de la mosca y efectos en la fecundidad y longevidad del vector (Hogehout y *col.*, 2008).

Los períodos mínimos de adquisición y de inoculación, descritos para los begomovirus del Viejo y Nuevo Mundo varían, de manera general, de diez a 60 minutos y de diez a 30 minutos, respectivamente (Santos y *col.*, 2003). El período de latencia después de la adquisición es de 17 a 20 horas, y una mosca adulta permanece virulífera de 7 a 20 días (Mehta y *col.*, 1994). Sin embargo, la eficiencia en la transmisión declina con el tiempo y la transmisión óptima se establece después de un tiempo de adquisición de 16-24 horas, seguido de un período de inoculación de 20-24 horas (Cuéllar y Morales, 2006; Czosnek, 2007).

Se han observado diferencias en la eficiencia de la transmisión de diferentes begomovirus por *Bemisia tabaci* (Mc Grath y Harrison, 1995; Jones, 2003), lo cual se ha tomado como fundamento para explicar el desplazamiento de un begomovirus por otro en regiones donde se ha detectado la existencia de varias especies virales y del insecto transmisor (Sánchez y *col.*, 1999).

Las moscas en el estadio de ninfas son tan eficientes en la adquisición del virus como las adultas (Caciagli y *col.*, 2000) sin embargo, se ha informado una disminución de la eficiencia en la transmisión con la edad del insecto (Hogehout y *col.*, 2008). Ghanim y Czosnek (2000) observaron la transmisión transovárica del TYLCV en, al menos, dos generaciones del biotipo B de *Bemisia*, y entre individuos a partir de la copulación (Czosnek, 2007). Para esta misma especie viral, se observó un resultado similar utilizando el biotipo Q. Se pudo apreciar que en ensayos cruzados, machos virulíferos del biotipo B no transmiten para hembras avirulíferas del biotipo Q, y viceversa, mostrando incompatibilidad entre los dos genotipos (Ghanim y Medina, 2007).

Una importante proteína, dentro de la familia de las chaperonas (GroEL), es producida por una bacteria endosimbionte que habita en la mosca blanca. Esta proteína tiene la función de proteger al virus durante su paso a través de la hemolinfa (desde el tracto digestivo hasta las glándulas salivares), desarrollando una función importante en la transmisión de TYLCV (Akad y *col.*, 2007; Czosnek, 2007).

#### **2.4.2 Métodos empleados para el control de la mosca blanca.**

Con los antecedentes expuestos, relacionados con la biología del vector; las relaciones que se establecen entre los begomovirus y *B. tabaci*, así como los mecanismos que estos fitopatógenos han desarrollado para mantenerse en los agroecosistemas, las estrategias de manejo deben ser de naturaleza múltiple y basadas en la comprensión del patosistema en cuestión (Caruana, 2007; Martínez, 2007). La aplicación frecuente de insecticidas, como método de control ampliamente practicado para *Bemisia tabaci*, origina la contaminación del medio ambiente, el surgimiento de plagas secundarias, la destrucción de sus enemigos naturales y un elevado costo de producción del tomate (Moriones y Navas, 2000; Taylor y col., 2001). Se ha observado que, esta práctica conlleva además la aparición de poblaciones de moscas resistentes al insecticida y el tratamiento resulta, a la larga, inefectivo (Roditakis y col., 2005).

Una alternativa que ha demostrado su rentabilidad para algunos cultivadores es la utilización de mallas con poros de 50 micrómetros de abertura, combinado con aplicaciones de insecticida para la contención del insecto transmisor en el cultivo de tomate protegido (Taylor y col., 2001). Sin embargo, su empleo no es 100% eficaz contra la mosca y no permite una adecuada aireación de las estructuras que encierra, lo cual provoca que se sobrecalienten (Moriones y Navas, 2000).

Otros autores proponen un modelo de probabilidad de clima para la identificación en el mundo de las regiones potencialmente susceptibles de ser invadidas por el complejo *Bemisia tabaci*-begomovirus (Morales y Jones, 2004). Algunas de estas, han sido cultivadas por décadas sin experimentar las consecuencias de una invasión de este tipo. Sin embargo, la introducción de un hospedante reproductivo apropiado para *Bemisia tabaci*, la llegada de períodos extensos de sequía y la existencia de reservorios naturales de begomovirus, podrían desatar la explosión de una epifitía en dichas regiones (Morales y Jones, 2004).

En Cuba, el control de la mosca blanca se ha basado en la aplicación de un programa de manejo integrado de lucha contra el vector, que comenzó a implementarse desde inicios de la década de los 90 y estuvo totalmente generalizado hacia 1995. El mismo incluye el

empleo de medidas agrotécnicas para el desarrollo de semilleros, el uso de controles biológicos (*Verticillium lecanii* y *Encarsia sp*) en algunas regiones, los que contribuyen a la disminución de la presencia de vectores en el campo, sobre todo en la etapa de semilleros (Vázquez, 1995) y el monitoreo de las áreas empleando métodos de diagnóstico (Murguido y Elisondo, 2007).

Sin embargo, todas las prácticas descritas anteriormente, desarrolladas en diferentes regiones del mundo y encaminadas al control del insecto transmisor de los begomovirus no han resultado eficientes para el manejo de la enfermedad. Principalmente, en las regiones donde la incidencia de begomovirus es alta, los productores de tomate han tenido que restringir el cultivo a los meses de menor incidencia del vector, y con esto reducir las cosechas anuales y proscribir los cultivares susceptibles. Por ende, la utilización de cultivares resistentes puede constituir una alternativa necesaria, para la complementación del manejo integrado del cultivo y sus plagas.

### **2.5 Mejoramiento genético del tomate para la resistencia a begomovirus.**

La existencia de, aproximadamente, 35 especies de begomovirus con una amplia gama de distribución en el mundo, ha sido una de las causas mayores en las pérdidas de producción de tomate. La no especificidad de los genes de resistencia a begomovirus particulares y la interacción genotipo-ambiente han permitido el mejoramiento genético de la hortaliza en muchas localidades y países del mundo (Vidavsky y col., 2006).

La resistencia a las enfermedades constituye uno de los principales objetivos en los programas de mejoramiento genético, de la mayoría de las especies agrícolas. Se estima que un 25% de los recursos destinados al mejoramiento convencional se han utilizado en la obtención de híbridos, líneas y cultivares resistentes a enfermedades (Borém y Miranda, 2005).

El uso de terminologías relacionadas con la respuesta de resistencia de las plantas a fitopatógenos varía de acuerdo con diferentes autores.

La terminología propuesta por Cooper y Jones (1983) utiliza los términos de resistencia y susceptibilidad para expresar la respuesta de la planta a la infección viral y los términos tolerancia y sensibilidad para indicar la respuesta de la planta a la enfermedad.

Siguiendo esta terminología, una planta resistente es aquella en la que la replicación y/o invasión del virus está restringida, mientras que una planta tolerante es aquella en la que a pesar de que el virus es capaz de causar infección sistémica, este no origina efectos significativos en el estado general de la planta. Por lo tanto, resistencia y tolerancia no serían conceptos incompatibles, dado que una planta puede restringir la infección viral (por lo tanto sería resistente al virus), aunque no suprimirla totalmente y, además, esta infección puede no tener efectos en el estado general de la planta (por lo tanto, sería tolerante a la enfermedad).

Los diferentes tipos de resistencia encontrados son muy diversos y pueden resultar en una interferencia con el desarrollo del virus a distintos niveles. Para una infección efectiva, los virus requieren la replicación de su genoma, la encapsidación y su movimiento desde el punto inicial de infección hacia distintos puntos de la planta. La interferencia en algún paso de este proceso puede limitar la infección viral y, por tanto, conferir resistencia. Para todos estos procesos, los virus codifican genes específicos, que pueden ser buenas dianas para el desarrollo de resistencia mediante su bloqueo (Goldbach y *col.*, 2003).

Para Lapidot y Friedmann (2002), una planta es resistente si es capaz de suprimir la multiplicación de un virus y, consecuentemente, el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, pasando la resistencia desde rangos muy altos, como la inmunidad (no multiplicación de virus), hasta niveles más bajos, donde plantas resistentes son capaces de acumular menor cantidad de virus que los materiales susceptibles. Para los mismos autores, la tolerancia es la única instancia donde, en respuesta a la infección viral, la planta hospedante expresa síntomas con niveles despreciables o ligeros de la enfermedad, pero soporta niveles de multiplicación del virus, alcanzando niveles aceptables de producción, estando muy relacionada, esta terminología, con los parámetros del rendimiento.

A pesar de los diversos criterios que existen entre fitopatólogos y mejoradores para evaluar la resistencia, esta continua siendo una de las tantas opciones que son empleadas para el fitomejoramiento a begomovirus. En este sentido, los programas de

mejoramiento de tomate se han basado en la introgresión de los genes de resistencia de las especies silvestres hacia la especie cultivada (Pérez y col., 2007a).

### **2.5.1 Fuentes de resistencia a begomovirus en *Solanum* spp.**

Las investigaciones para la identificación de fuentes de resistencia a begomovirus comenzaron en la década de los 70s (Laterrot, 1995). Actualmente, diversas formas y métodos son utilizados para la obtención de resistencia, incluyendo los métodos de mejoramiento clásico y las técnicas biotecnológicas (Lapidot y Friedmann, 2002).

Los graves daños ocasionados por los begomovirus causantes de amarilleamientos en tomate han llevado a una intensa búsqueda de fuentes de resistencia aplicables comercialmente. La misma se inició en la especie cultivada *S. lycopersicum*, en la cual no se encontraron niveles aceptables de resistencia o tolerancia (Picó y col., 1996). Por ello, los programas de mejora se han basado en la resistencia presente en especies silvestres emparentadas con el tomate. Se han citado como resistentes a begomovirus distintas accesiones pertenecientes a cinco especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon*: *S. galapagense*, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. habrochaites* y *S. chilense* (Scott, 2006; Ji y col., 2007b; Chen y col., 2011). Sin embargo, la mayoría de ellas no han sido empleadas en el desarrollo de líneas mejoradas o cultivares comerciales.

#### *Solanum pimpinellifolium*.

Los programas de mejoramiento genético a TYLCV comenzaron en Israel mediante la utilización de la accesión LA121 de *S. pimpinellifolium* (Pilowsky y Cohen, 1990). Sin embargo, las líneas derivadas, aunque manifestaron síntomas ligeros, mostraban una reducción importante del crecimiento y del rendimiento a causa de la enfermedad (Pilowsky y Cohen, 1990).

Los estudios con fuentes de resistencia de *S. pimpinellifolium* para el control a TYLCV fueron contradictorios. Pilowsky y Cohen (1974) describieron que la resistencia derivada de LA121 era monogénica con dominancia incompleta. Sin embargo, investigaciones posteriores realizadas por Hassan y col. (1984) señalaron que, en esta resistencia,

estaban implicados genes recesivos y que existía dominancia incompleta. Estos autores concluyeron además, que la resistencia en la accesión LA373 seguía el mismo modelo.

Otra fuente de resistencia fue hallada en *S. pimpinellifolium* por Kasrawi (1989) y por Vidavsky y Czosnek (1998), los cuales concluyeron que en la línea INRA-Hirsute y LA1478 existía un único gen dominante llamado *Tylc* involucrado en el mecanismo. Estudios posteriores indicaron que esta resistencia se correspondió con modificaciones en el comportamiento alimenticio de la mosca blanca que impedían la transmisión del virus (Delatte y *col.*, 2006).

En este sentido, Pérez y *col.* (2007a) estudiaron la genética de la resistencia de la accesión UPV 16991, de *S. pimpinellifolium* previamente descrita como resistente a TYLCD (Picó y *col.*, 2000), demostrando que la misma era de naturaleza parcial monogénica y con dominancia incompleta.

#### *Solanum peruvianum.*

En algunas de las accesiones de *S. peruvianum* se ha detectado resistencia a begomovirus. El primer híbrido comercial fue obtenido a partir de la entrada PI-126935 de esta especie y fue llamado 'TY20'. En este se observó retraso en el desarrollo de los síntomas, que eran más atenuados, y en la acumulación viral (Pilowsky y *col.*, 1989; Pilowsky y Cohen, 1990). Otras investigaciones, aprovecharon diferentes accesiones de *S. peruvianum* (PI-126926, PI-126930, PI-390681) para la obtención de líneas con mayores niveles de resistencia, tales como 'TY172' y 'TY197' (Lapidot y *col.*, 1997, 2006; Friedmann y *col.*, 1998).

Estudios posteriores, describieron la presencia del gen *Ty-5* en la línea 'TY172' como un QTL en el cromosoma 4 de tomate, el cual puede estar involucrado en los mecanismos que interfieren en la replicación y acumulación viral de TYLCV (Anbinder y *col.*, 2009).

Las búsquedas desarrolladas por Ji y *col.* (2007b) catalogaron a la especie *S. peruvianum* como la posible fuente de resistencia del híbrido comercial 'Tyking'. A partir de este material se han obtenido dos líneas que presentaron dos genes de resistencia a diferentes especies de begomovirus.

En este sentido el locus *tcm-1* (encontrado en la línea 'TX-468-RG' de *S. lycopersicum* derivada del híbrido 'Tyking'), confiere resistencia a los begomovirus de genomas bipartitos (Giordano y col., 2005a) y monopartitos (García y col., 2008) presentes en Brasil y España. Por otro lado, el locus *tgr-1* (encontrado en la línea FLA-653 derivada del cruzamiento realizado entre *S. chilense* (accesión LA-2779) y 'Tyking'), es un gen que parece estar relacionado con los mecanismos de supresión de la replicación viral e interferencia del movimiento de *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) (Bian y col., 2007).

*Solanum habrochaites*.

A partir de *S. habrochaites* se lograron materiales resistentes a enfermedades provocadas por begomovirus que causan amarilleamiento. Este es el caso de la resistencia derivada de la línea LA386 (*S. habrochaites*), controlada por más de un gen (Hassan y col., 1984).

Vidavsky y Czosnek (1998), obtuvieron una serie de líneas resistentes y tolerantes del cruce entre LA1777 y LA 386 (*S. habrochaites*). Una de ellas, particularmente interesante, fue la 902, caracterizada por conferir un impedimento en la replicación del virus que resultaba en ausencia de síntomas, incluso, tras ser inoculada con poblaciones masivas de mosca blanca.

Sin embargo, un relevante descubrimiento se produjo cuando en la accesión B6013 de *S. habrochaites* f. *glabratum* (Kalloo y Banerjee, 1990) se identificó un gen de resistencia a begomovirus, *Ty-2* que fue luego introducido en el cultivar 'H24' (Hanson y col., 2006).

El locus *Ty-2* ha mostrado niveles de resistencia frente a los aislados asiáticos de begomovirus (Hanson y col., 2000, 2006). Se localiza en el cromosoma 11 de la especie y es uno de los más empleados en los programas de mejora genética para TYLCV de tomate, en el AVRDC de Taiwán (Hanson y col., 2006), así como en la producción de semilla híbrida de nuevos materiales liberados al mercado internacional de numerosas corporaciones asiáticas (Green-Seeds, 2007). Se ha planteado que *Ty-2* confiere tolerancia a algunos linajes de TYLCV presentes en el mundo, como son los de Taiwán, norte de Vietnam, sur de la India e Israel, pero no a los del norte de la India, Tailandia, Filipinas y América Central (Mejía y col., 2005; AVRDC, 2006).

*Solanum chilense*.

Las mejores fuentes de resistencia a TYLCD identificadas hasta el momento, provienen de *S. chilense*. Zakay y col. (1991) describieron la resistencia a TYLCV en la accesión LA1969. Estudios realizados por otros autores, con este genotipo, han confirmado estos resultados (Scott y Schuster, 1991; Czosnek y col., 1993; Michelson y col., 1994; Picó y col., 1998; Pérez y col., 2005; Piñón y col., 2005). Esta resistencia está controlada por un gen mayor, denominado *Ty-1* (localizado en el cromosoma 6) y dos genes modificadores (Zamir y col., 1994) localizados en los cromosomas 3 y 7, respectivamente.

El nivel elevado de resistencia encontrado en esta accesión, así como el control genético relativamente sencillo de la misma, han determinado que sea de las más aprovechadas en los programas de mejoramiento para resistencia a begomovirus a nivel internacional (Chiang y col., 1994; Laterrot y Moretti, 1994; Scott y col., 1996; Gómez y col., 2004; Mejía y col., 2005; Piñón y col., 2005). Sin embargo, debe mencionarse que en condiciones de fuerte presión de infección, la mayor parte de los híbridos comerciales que incorporan la resistencia derivada de LA1969 terminan por mostrar síntomas de la enfermedad.

En otros estudios realizados con *S. chilense* se identificaron nuevos materiales con un comportamiento similar al de LA1969 (Pérez y col., 2004, 2005), ubicándose en los cromosomas 6 y 3 los genes *Ty-3* y *Ty-4*, respectivamente (Ji y Scott, 2006; Ji y col., 2009a).

El locus *Ty-3*, localizado sobre el brazo largo del cromosoma 6, fue introgresado en líneas avanzadas de tomate en la Florida (EE.UU), provenientes de un cruzamiento con *S. chilense*, accesiones LA2779 y LA1932 (Ji y col., 2007a). Los autores identificaron un segmento largo (27 cM) y uno más corto (6 cM) introgresados desde LA2779 y LA1932, respectivamente. Con el estudio de una progenie F<sub>2</sub>, se logró evidenciar que el gen *Ty-3* explicaba el 65% de la varianza para la resistencia al TYLCV, y el 30% para la resistencia al begomovirus bipartito *Tomato mottle virus* (ToMoV).

El gen *Ty-4* se detectó caracterizando líneas avanzadas derivadas de tres accesiones de *S. chilense*, y fue mapeado en el brazo largo del cromosoma 3, como un nuevo locus de resistencia a TYLCV, el cual expresó un menor efecto que el determinado por *Ty-3* (Ji y *col.*, 2009a).

## **2.6 Importancia de los métodos de inoculación viral y de las herramientas moleculares en un programa de mejoramiento genético de tomate a begomovirus.**

### ***2.6.1 Métodos utilizados para la inoculación de begomovirus en tomate.***

Los métodos que se utilizan para lograr la transmisión de begomovirus durante el escrutinio de materiales resistentes son numerosos. Sin embargo, garantizar un 100% de infección en las plantas y estandarizar la presión de inóculo, ha sido muy dificultoso (Inoue y *col.*, 2007).

La inoculación por la mosca blanca, constituye uno de los métodos que comúnmente son aprovechados por los programas de mejoramiento y que tienen mayor relación con lo que, de manera natural, ocurre en el agroecosistema (Lapidot, 2007). Algunos grupos de investigación utilizan diferentes metodologías para lograr un 100% de infección a través del insecto vector, de los cuales tres son los más relevantes. Uno de ellos es completamente natural (infección natural) y los dos restantes, artificiales (infección en masa e infección en jaula).

Las infecciones naturales ocurren en condiciones de campo abierto y son menos empleadas en las primeras etapas de la selección de materiales promisorios. En condiciones naturales, el vector se encuentra más disperso y por tanto, la selección de falsos resistentes podría ser una limitante del método (Niks y Lindhout, 2004).

La inoculación en masa permite que, con un número incontable de moscas y realizando el movimiento de las plantas para homogenizar el desplazamiento del vector, se garantice la infección de todos los materiales a evaluar. Generalmente, este método se emplea cuando se precisa contar con una presión de inóculo elevada o el número de plantas a inocular es mayor (Lapidot, 2007; Azizi y *col.*, 2008).

La inoculación en jaula, es un método que ha sido utilizado para distinguir cultivares de tomate con diferentes niveles de resistencia. Esta metodología garantiza un 100% de la infección durante un período de 48 horas y utiliza menor número de moscas (entre 3-15), por plantas a inocular (Inoue y *col.*, 2007).

La transmisión por injerto; agroinoculación y biobalística son otros de los métodos artificiales que se han empleado con tales fines.

El injerto, ha sido una técnica con elevada eficiencia en la transmisión para aprovechar en un número reducido de plantas. Sin embargo, el tiempo que se consume su realización está entre sus mayores limitantes (Friedmann y *col.*, 1998).

La agroinoculación, permite la introducción directa del ADN viral en las células vegetales a través de cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* transformados. Se puede realizar en discos de hojas, semillas germinadas o en plantas completas. Su uso es cuestionado por fitomejoradores pues “salta” las barreras o mecanismos de resistencia que se pueden establecer entre el insecto vector, la arquitectura o los compuestos químicos del hospedante (Picó y *col.*, 2001). Algunos autores describen como otras limitantes, el tiempo que se necesita para obtener el cultivo de la bacteria y la introducción de *A. tumefaciens* como otro patógeno dentro de la planta agroinfectada (Lapidot y *col.*, 2007)

La biobalística es otra de las técnicas usadas para la inoculación de begomovirus en tomate (Fernandes y *col.*, 2006; Calegario y *col.*, 2007). El ADN viral se adhiere a partículas de oro o tungsteno y la penetración se realiza con la ayuda de una pistola de genes (Zerbini y *col.*, 2006; Lapidot y *col.*, 2007). Se ha utilizado para inocular begomovirus con ambos genomas (Ramos y *col.*, 2003; Morilla y *col.*, 2005; Lapidot y *col.*, 2007) durante el tamizaje para la búsqueda de fuentes de resistencia en el cultivo (González y *col.*, 2007). Entre sus mayores limitantes están la disponibilidad y costo del equipamiento que se emplea, así como la dificultad en el logro de una estabilidad para la presión de inóculo por planta (Inoue y *col.*, 2007).

De manera general, a pesar de las bondades y limitantes que presentan los diferentes métodos de inoculación, existe una tendencia al empleo de la combinación de ellos para

la selección de cultivares inmunes, resistentes, tolerantes o susceptibles, así como para determinar el tipo de resistencia (Bian y *col.*, 2007).

Sin dudas, una vez que el patógeno está en la planta se necesita de ciertas herramientas para determinar su presencia, replicación, concentración o movimiento en el vegetal, así como en esclarecer los mecanismos genéticos que pueden influir en la actividad del patógeno.

### ***2.6.2 Herramientas moleculares empleadas en el mejoramiento genético de tomate a begomovirus.***

En varias de las etapas de la mejora, las técnicas de diagnóstico han constituido un instrumento necesario para el avance en los programas de fitomejoramiento ante diferentes enfermedades.

Entre los métodos que han sido aplicados para evaluar la resistencia en plantas se destacan los serológicos e inmunoenzimáticos (destacándose los ELISAs (*Enzyme-linked immunosorbent Assay*) y sus variantes) y las metodologías moleculares, como las pruebas de hibridación molecular y la RCP (Webster y *col.*, 2004; Betül y *col.*, 2008).

En el caso particular de los begomovirus, la detección y cuantificación utilizando técnicas serológicas han sido desarrolladas para diversas especies de este género y se han basado en la producción de anticuerpos contra la proteína de la cápside (Cancino y *col.*, 1995). A pesar de esto, varias dificultades han sido asociadas a estos métodos y su uso se hace cada vez más limitado, debido al inconveniente de obtener purificaciones virales a partir de extractos de plantas, por su exclusiva ubicación limitada al floema y además de registrarse muy bajas concentraciones de partículas en las plantas hospedantes (Martínez, 1998).

Por otra parte, el virión es pobremente inmunogénico y la mayoría de los anticuerpos monoclonales y policlonales existentes no permiten diferenciar los begomovirus, debido a las estrechas relaciones antigénicas entre las proteínas de la cápside de los miembros de este grupo (Wyatt y Brown, 1996). Sin embargo, a pesar de estas limitantes se han desarrollado anticuerpos monoclonales heterólogos que permiten distinguir entre

aislados del TYLCV de diferentes regiones (ejemplo, entre el TYLCV de Senegal y el de Nigeria) (Mc Grath y Harrison, 1995).

Los métodos más utilizados han sido la HAN y la RCP (Accotto y Noris, 2007). En el primer caso, el ADN fijado a las membranas absorbentes, se hibrida con sondas de ADN específicas. La especificidad de la hibridación puede ser controlada a través de la selección de la sonda de ADN y de las condiciones en las que se realizan los ensayos (temperatura en la hibridación y en los lavados, y la concentración de sales en los últimos). Las sondas se generan con isótopos radiactivos o se marcan no radiactivamente, lo que a su vez hace más versátil el método (Quiñones y *col.*, 2004).

La hibridación de ácidos nucleicos, ha sido una herramienta empleada por diversos programas de mejora genética del tomate, a nivel internacional, permitiendo el diagnóstico y estimación de las concentraciones virales de los materiales evaluados y la selección de genotipos resistentes (Picó y *col.*, 2001; Aidawati y *col.*, 2007; Betül y *col.*, 2008; Loconsole y *col.*, 2009).

En Cuba, resultados con aplicaciones de este método en el diagnóstico y manejo del TYLCV-IL [CU], han establecido una metodología que ofrece ventajas en el procesamiento masivo de muestras vegetales, con bajos riesgos de contaminación durante el análisis y una elevada especificidad (Martínez y *col.*, 2001; Quiñones y *col.*, 2004).

Por su parte, la RCP solo necesita cantidades pequeñas de tejido de partida y es mucho más sensible. Su especificidad puede ser controlada por medio de la selección de los cebadores y la temperatura a la que se realiza la hibridación de estos con el ADN molde.

El uso de los marcadores de ADN en la mejora de las plantas para resistencia, ha constituido un aspecto muy interesante. Esto resulta cierto, tanto para la resistencia completa heredada monogénicamente (vertical o raza específica), como para la que se hereda de modo cuantitativo (poligénica, raza no específica u horizontal). Los marcadores moleculares que están estrechamente ligados a los genes de resistencia a begomovirus, en tomate, han permitido reemplazar la selección directa para la

resistencia, por una selección indirecta asistida por la RCP (Pérez y *col.*, 2007b; Álvarez, 2011; Foolad y Panthee, 2012),

En Cuba y a nivel internacional, numerosos son los trabajos desarrollados por varios grupos de investigación en la introgresión de genes de resistencia de las especies silvestres a la especie cultivada (Zamir y *col.*, 1994; Piñón y *col.*, 2005; Hanson y *col.*, 2006; Ji y *col.*, 2007b). Esta metodología ha propiciado un avance considerable, en las etapas del programa de mejoramiento genético de la hortaliza y ha apoyado en la piramidación de varios genes de resistencia en un mismo material.

## **2.7 Tendencias y perspectivas del mejoramiento genético en tomate para la resistencia a begomovirus.**

En gran parte de las regiones productoras de tomate del planeta, no se ha logrado un manejo exitoso de los begomovirus. Para la mayoría de estos patógenos, las estrategias de manejo deberán tener varios componentes y estar basadas en el entendimiento integral del patosistema. Numerosos grupos de investigación, a nivel internacional, coinciden en que la obtención de cultivares resistentes constituye una estrategia de lucha contra esta enfermedad y una de las vías más económicas y ambientalmente “amistosas” para tales fines (Morales y *col.*, 2009; Hanssen y *col.*, 2010; Navas y *col.*, 2011).

Debido a la gran variabilidad de especies virales existentes, la incorporación de varios genes/alelos ha sido reconocida como una de las estrategias más interesantes y apropiadas en la búsqueda de una resistencia estable y amplia a estas enfermedades.

Hoy en día, la piramidación de genes de resistencia en una línea o cultivar ha devenido como una estrategia potente que permite incrementar la durabilidad y estabilidad de la resistencia a begomovirus (Vidavisky y *col.*, 2008).

Preferiblemente, estos genes de resistencia deben operar en diferentes etapas del proceso infectivo y, de esta forma, solo la ocurrencia de varias mutaciones simultáneas hará que se quiebre la resistencia (Djian y *col.*, 2006). Esta diversificación provocaría que el patógeno se enfrente simultáneamente con varios genes de resistencia, siendo más efectivo sembrar, en una misma región, cultivares con distintos genes de resistencia, o separarlos en el tiempo, sembrándolos durante períodos diferentes.

Actualmente, los esfuerzos siguen centrándose en la identificación de fuentes de resistencia a las diferentes especies virales que afectan al tomate. Estas búsquedas van encaminadas hacia las especies silvestres del género *Solanum* spp. y, una vez identificadas, son introgresadas en la especie cultivada (Ji y col., 2007b) para ser evaluadas en agroecosistemas diferentes (Boiteux y col., 2001, 2007; Santana y col., 2001; Mejía y col. 2005; Green y Shanmugasundaran, 2007; Nizio y col., 2008).

Por otro lado, nuevas líneas de investigación se han orientado hacia los aspectos relacionados con los mecanismos de antibiosis y antixenosis que desalienten la ovoposición y alimentación de *B. tabaci* (Toscano y col., 2002; Fancelli y col., 2003; Baldin y col., 2005). Estos tipos de resistencia pueden ser muy interesantes para su inclusión en programas de manejo integrado en los que se utilicen diferentes estrategias de control. Las dificultades de transferir la resistencia a *B. tabaci* desde *S. habrochaites* o *S. pennelli* por la complejidad de su control genético y la dificultad de eliminar características indeseables del parental donante, ligadas a estos genes de resistencia al insecto, han impedido que puedan ser introgresadas en el tomate cultivado (Momotaz y col., 2005).

En España, investigaciones desarrolladas por Alba (2006) describieron el aprovechamiento de la fuente de resistencia TO-937 de la especie *S. pimpinellifolium* por la presencia de tricomas glandulares tipo IV y producción de acilsacarosas que redujeron las visitas de adultos de *B. tabaci* a las plantas, lo que además se tradujo en una menor incidencia de TYLCD y ovoposición del insecto vector.

En Cuba, debido a la incidencia y prevalencia del TYLCV-IL [CU] y a las pérdidas causadas en el rendimiento, el Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova” (IIHLD) se dio a la tarea de introducir en el tomate genes de resistencia a begomovirus provenientes de la especie silvestre *S. chilense* (accesión LA 1969), con el uso de herramientas moleculares e indicadores agronómicos (Piñón y Gómez, 2003; Gómez y col., 2004 y Quiñones y col., 2004).

Esto permitió la obtención de nuevos híbridos tolerantes al virus; la creación de líneas resistentes (Piñón y Gómez, 2003; Gómez y col., 2004) y del cultivar ‘Vyta’ (portador

del gen *Ty-1*), con altos niveles de resistencia ante el begomovirus que ha causado la mayor epifitía en el cultivo del tomate en Cuba, TYLCV-II [CU] (Álvarez y *col.*, 2003; Piñón, 2009).

Sin embargo, investigaciones desarrolladas por Verdecia y *col.* (2003) describieron la presencia de síntomas de begomovirus en plantas de este cultivar, en la región oriental del país. Estos resultados sugieren la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia para su introducción y obtención de nuevos materiales genéticos, que porten otros genes o mecanismos de resistencia, ayudando a contrarrestar los efectos devastadores que provoca la enfermedad.

Hoy en día, la proyección estratégica del Programa Integral de Cultivos Varios del Ministerio de la Agricultura de Cuba, no permite la liberación y generalización de cultivares de tomate sin resistencia a begomovirus. Dicho programa se basa en establecer una estrategia de manejo integrado para el control del complejo mosca blanca-geminivirus, así como en obtener e introducir nuevos cultivares para consumo fresco con resistencia a estos patógenos y a otras enfermedades de importancia económica; con énfasis en aquellas de posible emergencia en el país (Pérez, 2010).

Los actuales avances en el campo de la biología molecular ofrecen la posibilidad de incorporar en las plantas caracteres de interés sin perder cualidades agronómicas en tiempos mucho más cortos que los empleados en los procesos de mejora clásica. Las investigaciones desarrollados por Fuentes y *col.* (2006) en la obtención de plantas transgénicas inmunes al aislado cubano de TYLCV pusieron de manifiesto tales bondades. Sin embargo, las legislaciones actuales para la liberación de transgénicos en Cuba, hacen que su uso sea solo como modelo biológico para el estudio e interpretación de eventos moleculares que acontecen en las plantas al ser inoculadas con el virus.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos generales.**

##### **3.1.1 Localidades y registro de variables climáticas.**

Los experimentos que componen la investigación fueron desarrollados en las áreas experimentales del Departamento de Genética y Mejoramiento de las plantas, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba y de los departamentos de Fitopatología y Fitotecnia de la Universidad Federal de Viçosa (UFV), Brasil.

El INCA está localizado a 23° latitud Norte y 82° 12' longitud Oeste, a 138 m sobre el nivel del mar; en el Km. 3 ½ de la carretera de Tapaste, municipio de San José de las Lajas, provincia Mayabeque, Cuba.

La Universidad Federal de Viçosa está ubicada en el municipio de Viçosa, en la región de la Zona Mata de Minas Gerais, a 20° 45' de latitud sur, 42° 52' de longitud oeste y a una altitud de 648,7 m sobre el nivel del mar.

Las variables climáticas temperatura media del aire en grados Celsius (°C), porcentaje de la humedad relativa del aire (%) y precipitaciones diarias del mes (mm), que incidieron durante el desarrollo de los experimentos fueron obtenidas de los registros de la Estación Meteorológica de Tapaste y del Boletín Meteorológico del municipio de Viçosa (Anexos 1 y 2).

##### **3.1.2 Material vegetal.**

###### ***Cultivares***

El material vegetal que se empleó en la investigación fueron cultivares de *Solanum lycopersicum* L. descritos como resistentes\* y susceptibles\*\* a diferentes aislados virales de TYLCV (Tabla 2), donados por la Dra. María José Diez Niclós, del *Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana* (COMAV), de la *Universidad Politécnica de Valencia* (UPV), España; el Dr. Peter Hanson, del *Asian Vegetable Research and Development Center* (AVRDC), de Taiwán; el Dr. Moshe Lapidot, del *Volcani Center* de Israel; el Dr. Giordano Boiteux, de EMBRAPA

Hortalizas; el Dr. Derly J. Henriques da Silva de la *Universidad Federal de Viçosa* (UFV); el Dr. Tomás Laguna del *Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria* (INTA), Nicaragua; la Dra. Olimpia Gómez Consuegra, del *Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova* (IIHLD); la Dra. Marta Álvarez Gil y el Dr. Carlos Moya López, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), estos tres últimos de Cuba.

**Tabla 2.** Cultivares utilizados en el tamizaje frente a las especies de begomovirus (con genomas monopartito y bipartito) y en la evaluación de la segregación de la resistencia a TYLCV-IL [CU].

Cultivar	Fuente de resistencia	Referencia
‘Vyta’*	Ty-1, a partir de <i>S. chilense</i> (LA 1969)	Gómez y col. (2004)
‘TY52’*	Ty-1, a partir de <i>S. chilense</i> (LA 1969)	Zamir y col. (1994)
‘H24’*	Ty-2, a partir de <i>S. habrochaites</i> (B6013)	Kallo y Bernerje (1990)
‘L7’*	Ty-2, selección de ‘CLN2762-246-7-19’	Mendoza (2009)
‘TX468- RG’*	tcm-1, a partir del híbrido ‘Tyking’ ( <i>S. lycopersicum</i> )	Giordano y col. (2005a)
‘PIMHIR’*	<i>S. pimpinellifolium</i>	Laterrot (1992)
‘STY2’*	A partir del híbrido ‘8484’ ( <i>S. lycopersicum</i> )	Lapidot y col. (2006)
‘STY3’*	A partir del híbrido ‘Fiona’ ( <i>S. lycopersicum</i> )	Lapidot y col. (2006)
‘STY4’*	A partir del híbrido ‘3761’ ( <i>S. lycopersicum</i> )	Lapidot y col. (2006)
‘STY5’*	A partir del híbrido ‘Tyking’ ( <i>S. lycopersicum</i> )	Lapidot y col. (2006)
‘STY6’*	A partir de <i>S. peruvianum</i> (PI 126930, PI 390681 y LA 441)	Lapidot y col. (1997)
‘STY7’*	A partir de <i>S. peruvianum</i> (PI 126930, PI 390681 y LA 441)	Friedman y col. (1998)
‘Campbell 28’**	ninguna	Álvarez y col. (2003)
‘STY1’**	ninguna	Lapidot y col. (2006)
‘Débora’**	ninguna	González (2007)
‘Amalia’**	ninguna	Álvarez y col. (2004)

### 3.1.3 Siembra y condiciones experimentales.

Las semillas de los cultivares en estudio fueron sembradas en bandejas de poliestireno con alveolos de 32,5 cm<sup>3</sup>, empleándose como sustrato orgánico 90% de humus de lombriz más 10% de Litonita (Casanova y col., 2007). Las plántulas fueron desarrolladas en un túnel protegido por polietileno en su parte superior y malla anti *Bemisia* de 10 x 14 hilos/cm<sup>2</sup> (50 mesh) por laterales y frentes. El semillero se mantuvo con la humedad requerida, hasta el momento de la inoculación y/o trasplante.

#### 3.1.3.1 Área experimental del INCA.

El trasplante de las posturas, luego de la inoculación artificial por mosca blanca, se realizó a canteros de 1 m de ancho, ubicados al aire libre, cubiertos con malla de sombreado de

propileno virgen (30%), que contenían una mezcla de suelo Nitisol ródico (Hernández y *col.*, 2005) y cachaza en proporción 3:1. La distribución de los cultivares fue aleatoria y se utilizó una distancia de plantación de 0,90 x 0,25 m.

Las plántulas inoculadas por *Agrobacterium tumefaciens* se trasplantaron a macetas plásticas de 1 L de capacidad que contenían el mismo sustrato orgánico de las bandejas de poliestireno y fueron mantenidas en casa de cristal, a una temperatura promedio de 28/24 °C (día/noche) y 80 ± 10% de humedad relativa, por un espacio de tiempo de 45 días después de la inoculación.

### **3.1.3.2 Área experimental de la Universidad Federal de Viçosa.**

Una vez germinadas las semillas de cada cultivar, se sembraron en vasos descartables de 45 mL, que contenían sustrato comercial para hortalizas (Tropstrato Hortaliças). Las plántulas inoculadas se trasplantaron a macetas plásticas de 1 L de capacidad que contenían el sustrato anterior y fueron mantenidas en un ambiente protegido (humedad relativa del 80 ± 10% y temperatura media diaria de 25 ± 2 °C) por 45 días después de la inoculación, para la observación y evaluación periódica de los síntomas.

Para el experimento de campo, la distribución de los cultivares fue aleatoria. El trasplante se realizó a una distancia entre surcos de 1,2 m y entre plantas de 0,6 m sobre un suelo Cambissolo (EMBRAPA, 2009) arado y gradado de acuerdo con los análisis de suelo propuesto por Ribeiro y *col.* (1999). Los manejos culturales se realizaron según la carta tecnológica del cultivo del departamento de Fitotecnia.

En ambas áreas experimentales, las plantas se tutoraron verticalmente con el uso del cordel tomatero. Los tutorados y deshijes se realizaron semanalmente. El control de arvenses se realizó de forma manual durante todo el ciclo del cultivo.

## **3.2 Evaluación de cultivares ante aislado de begomovirus monopartito.**

### **3.2.1 Cultivares inoculados con aislado cubano de TYLCV.**

El TYLCV-IL [CU] es un begomovirus monopartito, que presenta todos los genes involucrados con la replicación y el movimiento viral en un solo componente (Martínez y *col.*, 1996).

Para el estudio se utilizaron los cultivares ‘Vyta’, ‘TY52’, ‘H24’, ‘L7’, ‘TX468-RG’, ‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘STY3’, ‘STY4’, ‘STY5’, ‘STY6’, ‘STY7’, ‘Campbell 28’ y ‘STY1’ (referidos en la Tabla 2).

### **3.2.1.1 Inoculación de los cultivares, por mosca blanca.**

Los experimentos de inoculación por mosca blanca se desarrollaron durante el año 2009, para el período óptimo (21 de octubre-20 de diciembre) y de primavera-verano (21 de febrero-20 de marzo) del cultivo (Gómez y *col.*, 2000).

En condiciones de casa de cultivo se multiplicó una colonia de moscas blancas (*Bemisia tabaci* Biotipo B), alimentada de plantas del cultivar ‘Campbell 28’ previamente infectadas con TYLCV-IL [CU] y que mostró los síntomas típicos de la enfermedad causada por el virus. Esta colonia se creció en varias generaciones, en presencia de las plantas enfermas.

Las bandejas con las plántulas a inocular se colocaron en el interior de la casa de cultivo con temperaturas diarias de  $25 \pm 2$  °C, donde se mantuvo la colonia de mosca blanca previamente infectadas.

Se inocularon un total de diez plantas por cultivar, siempre en el estadio fenológico de dos hojas verdaderas. Los cultivares ‘Campbell 28’ y ‘STY1’ se emplearon como controles susceptibles al virus. Se usaron como controles negativos dos plantas de cada cultivar sin inocular con TYLCV-IL [CU]. Estas se mantuvieron en condiciones de aislador hasta el trasplante y se les realizó igual manejo cultural que a las plantas inoculadas.

Se empleó el método de inoculación en masa, bajo una presión de inóculo elevada (más de 100 insectos por planta), por un tiempo de 48 horas (Lapidot y *col.*, 2006). Para garantizar una inoculación efectiva y homogénea, las plántulas fueron sacudidas tres veces por día para propiciar la dispersión o movimiento del insecto vector. Una vez transcurridas las 48 horas de exposición se asperjaron con el insecticida sistémico Confidor® (Imidacloprid, Bayer, Alemania) para eliminar los insectos y garantizar que la inoculación fuera solo durante este tiempo.

Las plántulas inoculadas y sin inocular se trasplantaron al azar a los canteros de asbesto cemento situados a cielo abierto, que contenían una mezcla de suelo Nitisol ródico (Hernández y *col.*, 2005) y cachaza en proporción 3:1 (sección **3.1.3.1**), siguiendo las premisas de un diseño Completamente Aleatorizado. Para garantizar las condiciones experimentales iniciales de la infección se realizaron dos aspersiones con el insecticida cada 15 días después del trasplante.

### **3.2.1.2 Inoculación de los cultivares, por *Agrobacterium tumefaciens*.**

Para la inoculación de los cultivares se utilizó la cepa LBA 4404 (Hoekema, 1983) de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el dímero de TYLCV-IL [CU], clonado en el vector viral pPZP200, siguiendo la metodología descrita por Kheyr y *col.* (1994), con algunas modificaciones.

Previo a la inoculación, la cepa se puso a crecer durante 48 horas en medio YEB (para 1 L) (Lab-lemco 0,4 g, bacto peptona 0,5 g, sacarosa 0,5 g, extracto de levadura 0,1 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05 g, pH 7,2), con presencia de los antibióticos rifampicina, 50 mg.L<sup>-1</sup>; estreptomycin, 100 mg.L<sup>-1</sup> y kanamicina 30 mg.L<sup>-1</sup>. Una vez crecida la bacteria, se tomaron 100 µL del cultivo y se adicionaron a 100 mL de medio YEB sin antibióticos.

La bacteria se puso a crecer en incubadora toda la noche a 28 °C, hasta que la densidad óptica alcanzó una absorbancia de 0,6-0,9 unidades, medida a una longitud de onda de 620 nm. Este cultivo se centrifugó a 2000 g durante 10 min., se retiró el sobrenadante y las células precipitadas se resuspendieron en 100 mL de sales de MS (Murashige y Skoog, 1962) que contenía 200 µL de solución de acetosiringona. Inmediatamente después se procedió a inocular con la ayuda de una jeringa de 1 mL con aguja de calibre 25 G (gauge). Se depositaron de 30-40 µL de la suspensión celular en heridas hechas en el tallo a partir de múltiples punciones en las yemas axilares de las dos hojas verdaderas.

El experimento de agroinoculación se realizó de julio a octubre de 2011. Las plantas (diez por cada cultivar), se inocularon en el estadio fenológico de dos hojas verdaderas y se mantuvieron en casa de cristal, a una temperatura promedio de 28/24 °C (día/noche) y 80 ± 10% de humedad relativa, por un espacio de tiempo de 45 días después de inoculadas.

### **3.2.1.3 Evaluación de la severidad de la enfermedad provocada por la infección de TYLCV-IL [CU].**

Para evaluar la severidad de la enfermedad se utilizó la escala descrita por Lapidot y *col.* (2006), siguiendo una dinámica de muestreo de las plantas a los 15, 30 y 45 días posteriores a la inoculación (dpi). Todas las evaluaciones fueron hechas de manera individual a cada planta, durante las primeras horas de la mañana (8:00-9:00 am).

(i) TYLCV-IL [CU]: 0: planta sin síntoma; 1: planta con síntomas de amarilleamiento ligero en el margen de los folíolos de las hojas apicales; 2: planta con síntomas de amarilleamiento y encrespamiento menor de los folíolos apicales; 3: planta con gran rango de síntomas de amarilleamiento de las hojas, encrespamiento y acucharamiento, con alguna reducción del tamaño, pero la planta sigue creciendo; 4: planta con síntomas de amarilleamiento severo y retraso del crecimiento, encrespamiento y acucharamiento, se detiene el crecimiento de la planta.

### **3.2.1.4 Concentración de ADN viral en las plantas inoculadas con TYLCV-IL [CU].**

Para determinar la presencia y concentración del ADN viral se utilizó la técnica de hibridación de ácidos nucleicos (HAN) mediante el procedimiento de *dot blot* (Fuentes y *col.*, 2006). El ADN de las plantas inoculadas (cinco de cada cultivar) y sin inocular (una de cada cultivar), se extrajo según la metodología de Rom y *col.* (1993), a partir de dos discos de 6 mm de diámetro, que fueron colectados en las hojas apicales durante las mismas fechas en que se realizaron las evaluaciones de severidad, 15, 30 y 45 dpi.

Los discos fueron depositados en tubos de microcentrífugas de 1,5 mL y triturados con una punta de cristal en 30  $\mu$ L de una solución de NaOH 0,4 N. El extracto se centrifugó a 3000 g durante 2 min., se tomaron 3  $\mu$ L del sobrenadante de cada muestra y se mezclaron con 17  $\mu$ L de una solución de NaOH 0,4 N, aplicándose los 20  $\mu$ L resultantes sobre membranas de nailon cargadas positivamente (Hybond-N+, GE Healthcare) en condiciones de vacío. La fijación del ADN se realizó irradiando las membranas con luz ultravioleta (120  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) por 1 min., con el empleo del equipo UV-crosslinker ( $E=120 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ) (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido).

La prehibridación e hibridación del ADN se realizó según el protocolo descrito por Martínez y *col.* (2001). La solución de prehibridación e hibridación consistió en una solución comercial de Denhardt 5X (Sigma Chemical Co.), SSC 5X (150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7,0), 50% de formamida, 250 µg/mL de ADN de esperma de salmón, 50 mM de pirofosfato de sodio, pH 6,5 y 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS).

La sonda empleada para la hibridación consistió en un fragmento de ADN específico de la región intergénica del genoma de TYLCV-IL [CU], la cual fue marcada con  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (Centro de Isótopos, Cuba), empleando el método de iniciadores al azar según el protocolo establecido en el juego de reactivos *Megaprime*, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (*Amersham*).

La hibridación del ADN de las membranas se realizó a 42 °C durante toda la noche, en un horno de hibridación (ECOGEN). Posteriormente, se realizaron dos lavados: el primero a 42 °C durante 15 min., con una solución que contenía SSC 2X y SDS 0,1% (poco restringente) y el segundo a 55 °C durante 15 min., con una solución compuesta por SSC 1X y SDS 0,1% (ligeramente restringente). Después de los lavados, las membranas se expusieron en películas de rayos X (Kodak, mod. X-Omat AR), durante 4 horas a -70 °C. El revelado de los filmes se realizó de acuerdo a las condiciones recomendadas por la casa comercial.

Para la interpretación de los resultados se realizó una curva patrón a partir de concentraciones conocidas (10 ng.µL<sup>-1</sup>, 1 ng.µL<sup>-1</sup>, 0,1 ng.µL<sup>-1</sup> y 0,01 ng.µL<sup>-1</sup>) del genoma total de TYLCV-IL [CU], clonado en el plásmido pZ200 (Fuentes y *col.*, 2006), que sirvió de referencia para la estimación de la concentración del ADN viral contenido en el tejido foliar de los cultivares inoculados.

Aquellos cultivares agroinoculados que presentaron un comportamiento inmune se les comprobó la inhibición de la replicación viral por la técnica de HAN, mediante el procedimiento de *southern blot* (Southern, 1975). El ADN total de las plantas agroinoculadas (cinco de cada cultivar), controles enfermos y sanos se extrajo a partir de 3 g del tejido foliar de los folíolos apicales de cada una, siguiendo la metodología descrita por Dellaporta y *col.* (1983) a los 15 y 45 dpi.

La concentración de todas las preparaciones de ADN se estimó visualmente por medio de la electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % con tinción de bromuro de etidio a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> (Sambrook y *col.*, 1989). El ADN extraído se transfirió usando vacío con el empleo de la unidad de transferencia TE80 (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra) a membranas de nailon cargadas positivamente (Hybond-N+, GE Healthcare). El gel se trató con las soluciones desnaturalizante (NaOH 1,5 M y NaCl 1,5 M), neutralizante (Tris-HCl 0,5 M pH 8 y NaCl 1,5 M) y SSC 20X de acuerdo a las instrucciones descritas por el fabricante para el trabajo con las membranas de nailon (Hybond-N+). La fijación del ADN a las membranas, las condiciones de prehibridación, hibridación y el revelado se realizaron según se describen en esta sección.

### **3.3 Evaluación de la segregación de la resistencia a TYLCV-IL [CU] conferida por los genes de resistencia a begomovirus *Ty-1* y *Ty-2*.**

#### **3.3.1 Incorporación de los genes de resistencia a begomovirus *Ty-1* y *Ty-2*, en el cultivar ‘Amalia’.**

Los experimentos fueron desarrollados durante el período de siembra óptimo para el cultivo (21 de octubre-20 de diciembre) de los años 2009 y 2010, en el Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, del INCA.

Se realizó el cruzamiento entre plantas del cultivar ‘Amalia’ (Álvarez y *col.*, 2004), susceptible a TYLCV-IL [CU], utilizado como hembra; con los progenitores resistentes ‘TY52’ y ‘H24’, portadores de los genes de resistencia *Ty-1* y *Ty-2* (Tabla 2), como masculinos. Luego de obtenidas las plantas F<sub>1</sub> y posterior a su autofecundación, se obtuvieron las plantas de la generación F<sub>2</sub>.

##### **3.3.1.1 Inoculación del TYLCV-IL [CU], en cultivares parentales y poblaciones segregantes para los genes de resistencia a begomovirus *Ty-1* y *Ty-2*.**

La inoculación de las plántulas (10 de los cultivares progenitores y 75 de las dos poblaciones F<sub>2</sub>), se realizó a través del insecto vector, según se describe en la sección **3.2.1.1**. Se incluyó en el ensayo el cultivar ‘STY1’ como control susceptible a TYLCV (Lapidot y *col.*, 2006). Las plántulas inoculadas y controles (plantas no expuestas a las moscas infestadas con TYLCV-IL [CU]) se trasplantaron al azar a canteros de asbesto

cimiento situados a cielo abierto que contenían una mezcla de suelo Nitisol ródico (Hernández y *col.*, 2005) y cachaza en proporción 3:1. La siembra y manejos culturales se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección **3.1.3.1**, en el área experimental del INCA.

### **3.3.1.2 Evaluación de la severidad y estimación de la concentración del ADN.**

La evaluación de los síntomas de la enfermedad causada por TYLCV-IL [CU] se realizó a los 30 días posteriores a la inoculación a los progenitores y a las plantas F<sub>2</sub> de los dos cruzamientos. Se utilizó la escala descrita para la expresión de los valores de severidad (sección **3.2.1.3**).

Para la estimación del contenido de ADN viral en cada una de las plantas, estas se evaluaron mediante la técnica HAN de acuerdo a lo descrito en la sección **3.2.1.4**. De igual forma, se realizó una curva patrón que sirvió para estimar de manera comparativa, la acumulación de ADN viral en las plantas que fueron evaluadas (sección **3.2.1.4**).

## **3.4 Evaluación de cultivares ante aislados de begomovirus bipartitos.**

### **3.4.1 Cultivares inoculados con aislados brasileños de ToYSV y ToSRV.**

Los aislados brasileños de *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) y *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) utilizados, son begomovirus bipartitos pues presentan todos los genes involucrados con la replicación y movimiento viral en componentes separados, denominados ADN A y ADN B (Ambrozevicius y *col.*, 2002; Martins, 2008).

Para el estudio se utilizaron los cultivares ‘Vyta’, ‘TY52’, ‘H24’, ‘L7’, ‘TX468-RG’, ‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘STY3’, ‘STY4’, ‘STY5’, ‘STY6’, ‘STY7’, ‘Campbell 28’ y ‘Débora’ (referidos en la Tabla 2).

#### **3.4.1.1 Inoculación de los cultivares, por biobalística.**

Los experimentos fueron desarrollados de enero a junio de 2010, en el Departamento de Fitopatología de la UFV, Brasil.

Para la inoculación se utilizó el aislado Bi2 de ToYSV (Ambrozevicius y *col.*, 2002), obtenido a partir de una planta de tomate colectada en el municipio de São Joaquim de

Bicas, en la Zona Metalúrgica de Minas Gerais y el aislado BR: Pir1:05 de ToSRV (Martins, 2008) obtenido en el año 2005, a partir de una planta de tomate colectada en la región de Pirajú, São Paulo. Estos aislados se encontraron disponibles en la forma de clones infectivos, denominados pToYYSV-A1.2 y pToYYSV-B1.2, con ADN-A y ADN-B de ToYYSV, respectivamente (Andrade y *col.*, 2006), así como pVIR096 y pVIR97, con ADN A y ADN B de ToSRV, respectivamente (Martins, 2008).

La inoculación se realizó empleando 2 µg de cada componente genómico. Las plántulas se inocularon (diez por cada cultivar) vía biobalística (Aragão y *col.*, 1996), con un Acelerador de Micropartículas de la firma comercial *Biomics* en el estado fenológico de dos hojas verdaderas. Los cultivares ‘Campbell 28’ y ‘Débora’ se emplearon como controles susceptibles a los aislados virales de ToYYSV y ToSRV. Una plántula de cada material fue inoculada solamente con partículas de tungsteno, como control sano.

#### ***3.4.1.2 Evaluación de la severidad de la enfermedad provocada por la infección de ToYYSV y ToSRV.***

Para evaluar la severidad de la enfermedad se utilizó la escala descrita por Giordano y *col.* (2005b), adaptada a los síntomas característicos de cada aislado viral, siguiendo una dinámica de muestreo de las plantas a los 15, 30 y 45 dpi. Todas las evaluaciones fueron hechas de manera individual a cada planta, durante las primeras horas de la mañana (8:00-9:00 am).

(i) ToYYSV: 0: planta sin síntomas; 1: planta con punteaduras amarillas, mosaico leve y epinastía; 2: planta con mosaico severo, epinastía, distorsión foliar y reducción del crecimiento.

(ii) ToRSV: 0: planta sin síntomas; 1: planta con amarilleamiento y arrugamiento de los folíolos; 2: planta con mosaico, clorosis, deformación foliar y reducción del crecimiento.

#### ***3.4.1.3 Concentración de ADN viral en las plantas inoculadas con ToYYSV y ToSRV.***

Para determinar la presencia y concentración del ADN viral se utilizó la técnica de hibridación de ácidos nucleicos (HAN) del tipo no radiactiva (Quiñones y *col.*, 2007) mediante el procedimiento de *dot blot*. El ADN total de los clones pToYYSV-A1.2 y pVIR096 se empleó como sonda y se marcó con digoxigenina, según el protocolo

establecido en el juego de reactivos *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (*Roche*).

El ADN total de las plantas inoculadas (cinco de cada cultivar) y sin inocular (una de cada cultivar) se extrajo según Dellaporta y *col.* (1983), a partir de dos discos de 6 mm de diámetro, que fueron colectados en los foliolos apicales durante las mismas fechas en que se realizaron las evaluaciones de severidad. Un total de 100  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{L}$  de ADN extraído y de 50  $\mu\text{L}$  de solución de SSC 16X y Formaldehído 7,5%), fueron aplicados sobre las membranas de nailon cargadas positivamente (Hybond-N+, GE Healthcare), en condiciones de vacío. La fijación del ADN se realizó según lo descrito en la sección **3.2.1.4**.

La pre hibridación e hibridación de las membranas se realizaron a 50  $^{\circ}\text{C}$  en un horno de hibridación (ECOGEN), siguiendo los protocolos generales de trabajo del Laboratorio de Virología Vegetal Molecular de la UFV. La pre hibridación de las membranas se realizó por un tiempo de 2 horas y la hibridación durante toda la noche. Posterior a la hibridación, se realizaron dos lavados a temperatura ambiente en solución de SSC 0,5X y SDS 0,1% por 5 min. cada uno y otros dos lavados a 65  $^{\circ}\text{C}$  en soluciones de SSC 0,1X y SDS 0,1% por 15 min. cada uno.

Las membranas fueron incubadas durante 30 min. con la solución de bloqueo, seguido de la incubación, por 30 min., en la solución de anticuerpo (anti digoxigenina), contenidas en el juego de reactivos *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*, de la firma comercial *Roche*. Fueron realizados dos lavados de 15 min. en tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,3%). Para el revelado se adicionó el sustrato CSPD (sustrato quimioluminiscente para la fosfatasa alcalina) en tampón de revelado (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 9,5). La incubación de este se realizó por 5 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el exceso de líquido y las membranas fueron incubadas a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min. La exposición de los filmes de rayos X (Kodak, mod. X-Omat AR), se realizó durante 20 min. para su posterior revelado fotográfico.

Para cada membrana se adicionaron como controles de reacción, ADN de plantas no inoculadas como control sano, agua mili Q y ADN de planta infectada, con una concentración predeterminada de  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de ADN viral, como referente para la estimación (mediante escala) de la concentración de ADN viral en el tejido foliar de los cultivares inoculados, de acuerdo a lo descrito por González (2011) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores de escala adoptados para la estimación del contenido viral de las plantas inoculadas con los aislados virales de ToYSV y ToSRV, a partir de una concentración conocida de  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de ADN viral en las membranas hibridadas.

Escala	Concentración de ADN viral.
0	Muestra de planta sin detección de ADN viral.
1	Muestra de planta con una concentración de ADN viral inferior a los $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .
2	Muestra de planta con una concentración de ADN viral igual a los $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .
3	Muestra de planta con una concentración de ADN viral superior a los $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

#### ***3.4.2 Evaluación de cultivares frente a begomovirus bipartitos, en condiciones de infección natural.***

El experimento se desarrolló de enero a junio de 2010 en el área experimental del Departamento de Fitotecnia de la UFV, sin previa inoculación de las plantas. La infección se produjo de manera natural por libre elección del insecto vector y en el estadio fenológico de cuatro hojas verdaderas. Para el estudio se utilizaron los mismos cultivares que fueron inoculados con los begomovirus ToYSV y ToSRV (sección 3.4.1). El diseño que se empleó fue el de Bloques al Azar con dos réplicas y un total de cinco plantas por parcela, de cada cultivar.

Para garantizar una presión de inóculo elevada no se realizaron aplicaciones de insecticidas para el control de la mosca blanca; se sembraron plantas del cultivar susceptible 'Débora' en surcos intercalados al de los cultivares a evaluar; no se eliminaron las arvenses ni restos de cultivos de tomate de otros experimentos, que presentaban los síntomas típicos de begomovirus y que colindaban con el área experimental.

Las evaluaciones de los síntomas se realizaron a los 60 días después del trasplante (dpt) a cada planta. Los datos de observación se tomaron durante las primeras horas de la mañana (8:00-9:00 am). Se determinó el número de plantas con síntomas, así como las descripciones de los síntomas presentes.

Para la identificación de las especies virales, se colectaron muestras de dos discos de 6 mm. en tubos de microcentrífugas de 1,5 mL, a partir de los foliolos apicales de tres plantas al azar, de cada cultivar, por cada bloque o parcela. El procesamiento de las muestras para la extracción del ADN, fijación en las membranas, hibridación y clones empleados para el análisis fueron los mismos que los descritos en la sección **3.4.1.3**.

Para este experimento, conjuntamente a los clones utilizados en la sección **3.4.1.1**, se empleó el clon pVir 054 (SiMMV ADN-A), obtenido a partir del aislado viral BR: Pda8:05 de *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), por encontrarse en el área experimental plantas de *Sida* spp. con síntomas típicos de begomovirus; por las relaciones filogenéticas que existen entre los aislados virales de *Sida* spp. con ToYSV (Calegario y col., 2007) y por ser este clon aislado a partir de una planta de tomate colectada en el municipio de Paty de Alferes, Río de Janeiro, Brasil (Castillo, 2008).

Se prepararon tres membranas para la hibridación con los clones de los virus ToYSV, ToSRV y SiMMV, para determinar aquellas plantas que presentaron una sola especie viral o infecciones mixtas.

### **3.5 Determinación de la presencia de los genes de resistencia a begomovirus *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3* en cultivares de tomate.**

Para determinar la presencia de los genes *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3*, en los cultivares ‘Vyta’, ‘TY52’, ‘L7’, ‘H24’, ‘TX468-RG’, ‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘STY3’, ‘STY4’, ‘STY5’, ‘STY6’, ‘STY7’, ‘Campbell 28’ y ‘STY1’, se dispuso del uso de los marcadores moleculares de ADN, ligados a estos, según lo informado por la literatura (Tabla 4).

El ADN total se extrajo a partir de 5 g del tejido foliar de los foliolos apicales de cada cultivar. Las muestras fueron maceradas en mortero con ayuda de nitrógeno líquido, siguiendo la metodología descrita por Dellaporta y col. (1983). Se procesaron tres réplicas con tres repeticiones para cada caso y la calidad del ADN fue determinada con la lectura de la densidad óptica a los 260 nm en un espectrofotómetro de luz visible (Ultraspec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB).

Para la amplificación de los genes *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3* se emplearon, mezclas de reacción y programas específicos para cada cebador, utilizando un termociclador (MJ Research, Inc.).

Para determinar la presencia del gen *Ty-1*, las reacciones de amplificación se ajustaron a un volumen final de 25 µL. Se utilizó 1U de la enzima Taq ADN Polimerasa, con 0,4 mM de cada dNTP, 2,5mM de tampón de reacción 10X (Promega), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 2,5 µM de cada cebador y 10 ng.µL<sup>-1</sup> del ADN de la muestra. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min., seguida por 30 ciclos de reacción (30s. a 94 °C de desnaturalización, 30s. a 55 °C de anillamiento de los cebadores y 1min. a 72 °C de extensión), seguido por un paso de extensión final durante 10 min. a 72 °C.

Una vez obtenido el producto de amplificación se realizó la digestión del ADN amplificado para la liberación de las bandas relacionadas con los patrones de resistencia y susceptibilidad del marcador. Para la digestión fueron establecidas las siguientes condiciones: para un volumen final de 25 µL, se utilizaron 5U de la enzima de corte (endonucleasa) Taq I (Promega), con 2,5 mM de tampón de reacción 10X de la enzima (Promega) y 10 µL del producto de amplificación de la RCP. Esta mezcla se incubó a 65 °C durante dos horas (García y col., 2007).

**Tabla 4.** Secuencia de los cebadores utilizados para revelar la presencia de los marcadores de los genes *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3*, relacionados con la resistencia a begomovirus.

Gen	Cebador y secuencia.	Referencia.
<i>Ty-1</i>	UWTy1F 5' ATA AGC ATT TCA TGT CAG ATG TCT AGA C 3'	García y col. (2007).
	UWTy1R 5' CTA GAT CCT GGA TGA CTT CAA TAG C 3'	
<i>Ty-2</i>	T0302F 5' TGGCTCATCCTGAAGCTGATAGCGC 3'	García y col. (2007).
	T0302R 5' AGTGTACATCCTTGCCATTGACT 3'	
<i>Ty-3</i>	FLUW-25F 5' CAAGTGTGCATATACTTCATATTCCACC 3'	Salus y Maxwell (2006).
	FLUW-25R 5' CCATATATAACCTCTGTTTCTATTTCGAC 3'	

Para determinar la presencia del gen *Ty-2*, las reacciones de amplificación se ajustaron a un volumen final de 25 µL. Se utilizó 1U de la enzima Taq ADN Polimerasa, con 0,4 mM de cada dNTP, 2,5 mM de tampón de reacción 10X (Promega), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 2,5 µM de cada cebador y 10 ng.µL<sup>-1</sup> del ADN de la muestra. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5

min., seguida por 35 ciclos de reacción (30s. a 94 °C de desnaturalización, 1 min. a 55 °C de anillamiento de los cebadores y 2min. a 72 °C de extensión), seguido por un paso de extensión final durante 10 min. a 72 °C (García y *col.*, 2007).

En el caso del gen *Ty-3*, las reacciones de amplificación se ajustaron a un volumen final de 25 µL. Se utilizó 1U de la enzima Taq ADN Polimerasa, con 0,4 mM de cada dNTP, 2,5 mM de tampón de reacción 10X (Promega), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 2,5 µM de cada cebador y 15 ng.µL<sup>-1</sup> del ADN de la muestra. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 min., seguida por 35 ciclos de reacción (30s. a 94 °C de desnaturalización, 1 min. a 53 °C de anillamiento de los cebadores y 1min. a 72 °C de extensión), seguido por un paso de extensión final durante 10 min. a 72 °C (Salus y Maxwell, 2006).

De manera general, los resultados obtenidos de las RCP, para la determinación de los genes de resistencia, se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito por Sambrook y *col.* (1989). Las electroforesis de los productos obtenidos para el gen *Ty-1*, se analizaron en un gel de agarosa al 2% y para los genes *Ty-2* y *Ty-3*, en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Se utilizó como patrón molecular un marcador de 100 pb (Fermentas) y como genotipo con patrón fenotípico susceptible, para los tres genes, al cultivar ‘Campbell 28’. Los geles fueron observados en un transiluminador UV (*Fotodyne*, Foto/UV® 26).

### **3.6 Análisis estadístico.**

Los datos correspondientes a las evaluaciones de severidad y concentración del ADN viral, para los tres aislados virales, fueron analizados mediante estadísticos descriptivos con el empleo del paquete estadístico SPSS, versión 11.0 para Windows.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

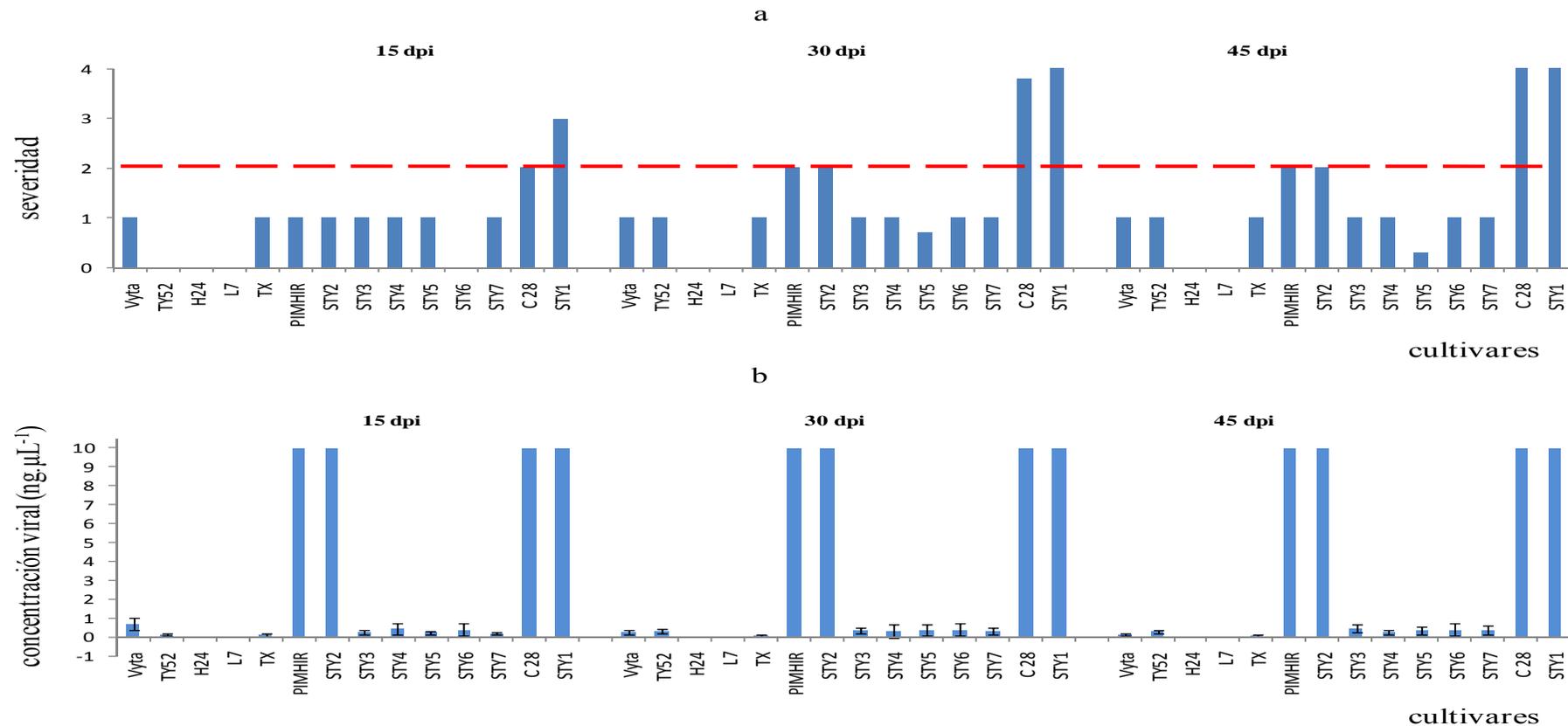
### **4.1 Evaluación de cultivares ante aislado de begomovirus monopartito.**

#### **4.1.1 Cultivares inoculados con TYLCV-IL [CU], por mosca blanca.**

La figura 3, muestran los valores promedio de severidad y contenido viral detectados, en todos los cultivares, a partir de la dinámica del muestreo realizada en el período óptimo de siembra del cultivo.

Transcurridos solo 15 días de la inoculación, los cultivares ‘Campbell 28’ y ‘STY1’, empleados como controles susceptibles, mostraron síntomas evidentes de la infección que fueron igual y superior a 2, los cuales resultaron más intensos y mostraron un aumento progresivo hasta alcanzar el grado 4 (máximo valor de severidad), a los 30 y 45 días después de realizada la inoculación (Fig. 3a), lo que se correspondió con la máxima concentración del contenido viral ( $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) en todas las plantas (Fig. 3b). La rapidez en la aparición de los síntomas y la concentración máxima de ADN viral, confirmó la ausencia de barreras para la resistencia a TYLCV en estos cultivares, las cuales según Gómez y *col.* (2009) se activan en los momentos tempranos de la inoculación y actúan a diferentes niveles en la célula, entre células y a larga distancia, por los tejidos conductores.

En este sentido, los cultivares ‘PIMHIR’ y ‘STY2’ también presentaron el valor máximo de concentración viral en sus plantas, durante todas las etapas del muestreo (Fig. 3b) y alcanzaron la condición de susceptible cuando a partir de los 30 días después de realizada la inoculación, las plantas mostraron los síntomas típicos de TYLCV-IL [CU], los que se correspondieron con un valor de 2 en la escala de severidad (Fig. 3a). Las diferencias mostradas en la sintomatología de estos cultivares, con respecto a la de los controles susceptibles, se puede relacionar con la presencia de mecanismos de defensa de las plantas que, aunque no garantizaron una resistencia a TYLCV-IL [CU], provocaron un retardo en la aparición y expresión de los síntomas, los cuales no llegaron a ser tan severos como en los controles susceptibles para la enfermedad, ‘Campbell 28’ y ‘STY1’.



**Figura 3. a.** Valores promedio de severidad\* expresados por los cultivares en estudio, ante la inoculación de TYLCV-IL [CU] por el insecto vector *Bemisia tabaci*, durante el período óptimo de siembra, del año 2009.

\*: escala de severidad propuesta por Lapidot y *col.* (2006) para TYLCV, donde 0: planta sin síntomas; 1: planta con síntomas de amarilleamiento ligero en el margen de los folíolos de las hojas apicales; 2: planta con síntomas de amarilleamiento y encrespamiento menor de los folíolos apicales; 3: planta con gran rango de síntomas de amarilleamiento de las hojas, encrespamiento y acucharamiento, con alguna reducción del tamaño, pero la planta sigue creciendo; 4: planta con síntomas de amarilleamiento severo y retraso del crecimiento, encrespamiento y acucharamiento, se detiene el crecimiento de la planta.

**b.** Valores promedio del contenido viral de cinco muestras al azar por cada cultivar, atendiendo a concentraciones conocidas de una curva patrón \*. Dinámica del muestreo realizada durante el período óptimo de siembra del año 2009.

\*: curva confeccionada a partir de concentraciones conocidas ( $10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ,  $1 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$  y  $0,01 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ) del genoma total de TYLCV-IL [CU], clonado en el plásmido pZ200 (Fuentes y *col.*, 2006).

Lapidot y Friedmann (2002) se refirieron a la disparidad que existe entre los fitopatólogos y los mejoradores al definir el término ‘resistencia’. Estos autores consideran resistente: *“aquella planta hospedante que puede suprimir la multiplicación de un virus y, consecuentemente, detener el desarrollo de la enfermedad. Esta resistencia puede ser alta, moderada o poca y las plantas resistentes pueden acumular menos virus que las susceptibles, así como expresar síntomas ligeros de la enfermedad o retener su aparición”*. Este concepto fue el que se tuvo en cuenta para la caracterización de todos los cultivares frente a las tres especies de begomovirus.

Para la selección de los cultivares resistentes a TYLCV-IL [CU] se tuvo como criterio la identificación de aquellos que presentaron valores promedio de severidad por debajo de 2 y una infección restringida del virus, determinada por valores promedio del contenido viral inferiores a  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de ADN.

En este sentido, los cultivares ‘Vyta’, ‘TX468-RG’, ‘STY3’, ‘STY4’ y ‘STY7’ mostraron un comportamiento resistente entre los 15 y 45 días del muestreo. La sintomatología de todas estas plantas, estuvo caracterizada por la presencia de amarilleamientos ligeros, casi imperceptibles, en los márgenes de los folíolos de las hojas apicales, lo cual se correspondió con un valor máximo de 1 en la escala de severidad y de concentraciones virales promedio menores a  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , a los 15, 30 y 45 días después de realizada la inoculación (Fig. 3).

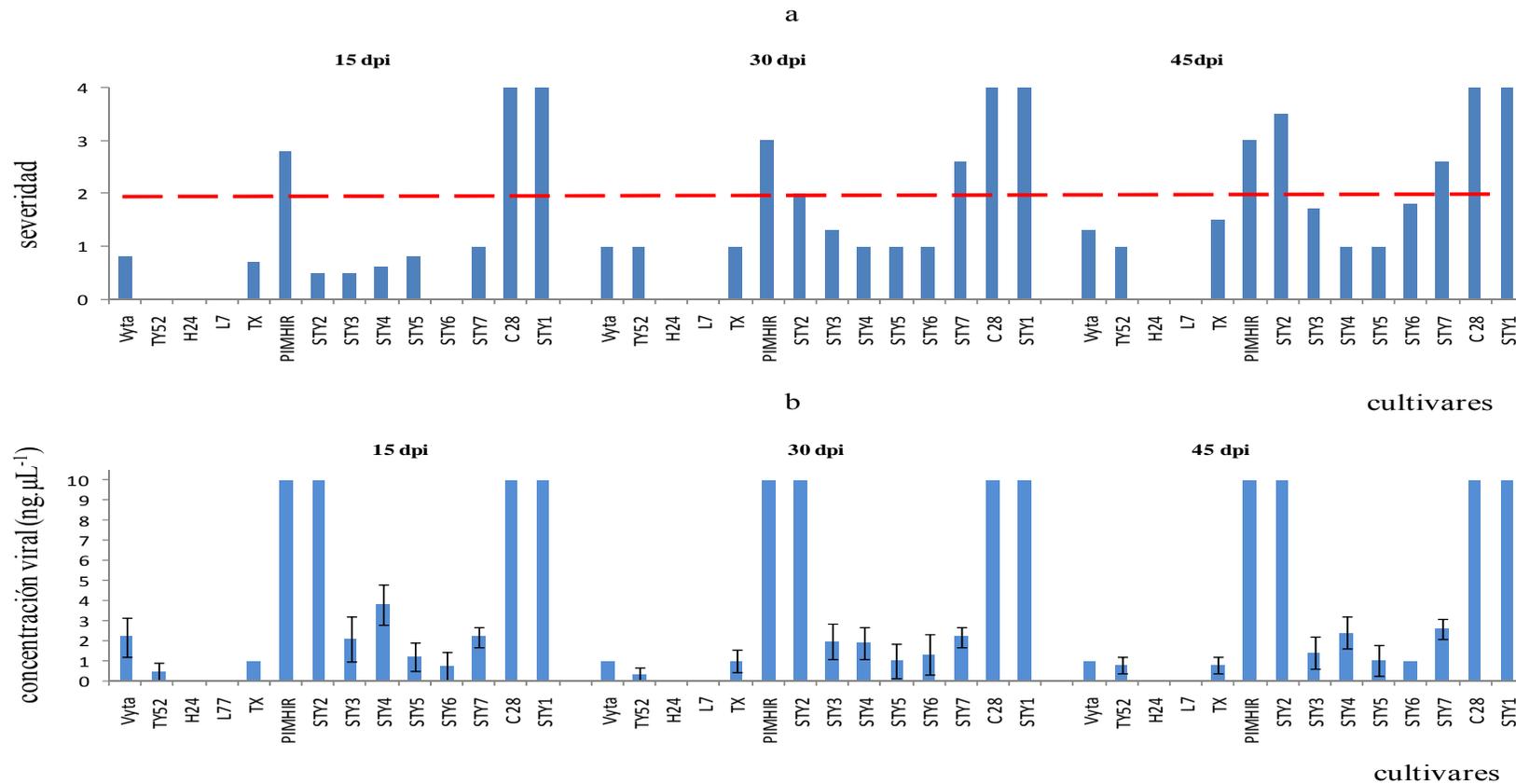
Un comportamiento similar fue el que mostraron las plantas de los cultivares ‘TY52’, ‘STY6’ y ‘STY5’ ante la infección por TYLCV-IL [CU]. Para los dos primeros, se presentaron infecciones latentes (terminología empleada por Calegario y *col.* 2007, relacionada con la presencia de plantas asintomáticas que multiplican virus) a los 15 días de la evaluación (Fig. 3) en tanto que, para las plantas de ‘STY5’ se observó una disminución en los valores promedio de los síntomas a los 30 y 45 días después de realizada la inoculación (Fig. 3a). De manera general, para todos los cultivares clasificados como resistentes ante la inoculación con TYLCV-IL [CU], el contenido de ADN viral fue poco variable durante la dinámica del muestreo y el promedio de concentración se mantuvo, siempre, en valores por debajo de  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (Fig. 3b).

Resultó muy interesante la respuesta de los cultivares ‘H24’ y ‘L7’ durante todas las evaluaciones realizadas, en el tiempo, frente al aislado cubano de TYLCV. Las plantas de estos, no mostraron ninguna de las sintomatologías descritas para la enfermedad que causa esta especie viral (grado cero en la escala empleada) (Fig. 3a). Esta carencia de síntomas se correspondió, a su vez, con la no detección de ADN del virus (Fig. 3b), lo que evidenció el fenotipo inmune de estos cultivares a esta especie.

De manera general se identificaron, para este período de evaluación, cuatro cultivares susceptibles (‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘Campbell 28’ y ‘STY1’), ocho cultivares resistentes (‘Vyta’, ‘TY52’, ‘TX468-RG’, ‘STY3’, ‘STY4’, ‘STY5’, ‘STY6’ y ‘STY7’) y dos cultivares inmunes (‘H24’ y ‘L7’) notándose, además, que a partir de los 30 días después de realizada la inoculación fue posible identificar el total de cultivares susceptibles, dos más (‘PIMHIR’ y ‘STY2’) que los observados en los primeros 15 días después de inoculadas las plantas (Fig. 3).

Los resultados alcanzados durante esta primera etapa de evaluación fueron importantes. Sin embargo, resultaba necesario conocer cómo sería el comportamiento de todos los cultivares inoculados con TYLCV-IL [CU], en uno de los períodos de siembra menos favorables para el desarrollo del cultivo en Cuba, el cual favorece el desarrollo del vector, de la enfermedad y se caracteriza por sus temperaturas elevadas y un número significativo de precipitaciones. La figura 4, muestra los valores promedio de severidad y contenido viral detectados, para todos los cultivares, durante la dinámica del muestreo realizado en el período de siembra primavera-verano, del cultivo.

Transcurridos solo 15 días de la inoculación, todas las plantas de los cultivares ‘Campbell 28’ y ‘STY1’, empleados como controles susceptibles, ya mostraban los síntomas extremos de la infección por TYLCV-IL [CU] (grado 4, valor máximo de la escala empleada) correspondiéndose, a su vez, con los valores máximos de contenido viral (Fig. 4). Estos valores de severidad y concentración del virus fueron invariables a los 30 y 45 días después de la inoculación. La presencia temprana de la máxima expresión de síntomas en estos cultivares confirmó la efectividad de la inoculación con TYLCV-IL [CU] y el empleo acertado como controles susceptibles a la enfermedad.



**Figura 4. a.** Valores promedio de severidad\* expresados por los cultivares en estudio, ante la inoculación de TYLCV-IL [CU] por el insecto vector *Bemisia tabaci*, durante el periodo de siembra primavera-verano, del año 2009.

\*: escala de severidad propuesta por Lapidot y *col.* (2006) para TYLCV, donde 0: planta sin síntomas; 1: planta con síntomas de amarillamiento ligero en el margen de los folíolos de las hojas apicales; 2: planta con síntomas de amarillamiento y encrespamiento menor de los folíolos apicales; 3: planta con gran rango de síntomas de amarillamiento de las hojas, encrespamiento y acucharamiento, con alguna reducción del tamaño, pero la planta sigue creciendo; 4: planta con síntomas de amarillamiento severo y retraso del crecimiento, encrespamiento y acucharamiento, se detiene el crecimiento de la planta.

**b.** Valores promedio del contenido viral de cinco muestras al azar por cada cultivar, atendiendo a concentraciones conocidas de una curva patrón  
\*. Dinámica del muestreo realizada durante el periodo de siembra primavera-verano del año 2009.

\*: curva confeccionada a partir de concentraciones conocidas (10 ng.µL<sup>-1</sup>, 1 ng.µL<sup>-1</sup>, 0,1 ng.µL<sup>-1</sup> y 0,01 ng.µL<sup>-1</sup>) del genoma total de TYLCV-IL

Según Byoung y *col.* (2005) la susceptibilidad a un virus implica que el patógeno es capaz de replicarse en las células que primeramente infectó, moverse hacia células vecinas a través de los plasmodesmos y colonizar toda la planta usando los tejidos vasculares logrando con la mayor rapidez en el tiempo, la expresión máxima de los síntomas de la enfermedad en el hospedante.

‘PIMHIR’ fue otro de los cultivares que presentó un comportamiento susceptible al virus, a solo 15 días de realizada la inoculación. Todas sus plantas mostraron amarilleamiento en sus hojas, encrespamiento, acucharamiento y reducción en el tamaño de los folíolos de las hojas apicales. Estos síntomas de la infección se correspondieron con un grado de 3 en la escala empleada para la evaluación de la severidad. Este valor no varió durante evaluaciones posteriores a los 30 y 45 días de la inoculación (Fig. 4a) correspondiéndose con el máximo valor de contenido del ADN viral (Fig. 4b).

En este sentido, el cultivar ‘STY2’ también presentó el máximo valor de concentración del virus en sus plantas, durante todas las etapas del muestreo (Fig. 4b) y alcanzó la condición de susceptible cuando a los 30 y 45 días después de realizada la inoculación, las plantas mostraron los síntomas típicos de TYLCV-IL [CU], los que se correspondieron con un valor promedio de 2 y superior a 3 en la escala de evaluación (Fig. 4a), respectivamente.

Un resultado diferente al obtenido en la evaluación realizada durante el período de siembra óptimo del cultivo, se observó en ‘STY7’. Este cultivar presentó un comportamiento susceptible, cuando a partir de los 30 días después de realizada la inoculación, los valores promedio de severidad fueron superiores a 2. Sin embargo y a diferencia de las plantas de los cultivares ‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘Campbell 28’ y ‘STY1’, en estas se detectaron valores promedio de concentración viral que oscilaron entre los 2  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  y 3  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de ADN, que fueron suficientes para alcanzar tal condición (Fig. 4).

Aún cuando las condiciones climáticas para el período de siembra primavera-verano resultan más favorables para el desarrollo de la plaga y menos para el desarrollo del cultivo, los cultivares clasificados como resistentes durante el período óptimo de siembra mantuvieron esta condición, excepto ‘STY7’. Este comportamiento demostró la

estabilidad de la resistencia en la mayoría de los cultivares frente al aislado cubano de TYLCV.

En este sentido, los cultivares ‘Vyta’, ‘TX468-RG’, ‘STY3’, ‘STY4’ y ‘STY5’ mostraron un comportamiento resistente, durante la dinámica del muestreo. La sintomatología de todas las plantas, estuvo determinada por la presencia de amarilleamientos ligeros, casi imperceptibles, en los márgenes de los folíolos de las hojas apicales, lo cuales aumentaron a los 30 dpi y 45 dpi, sin llegar a sobrepasar los valores promedio de 2 en la escala de síntomas (Fig. 4a). El análisis de los valores promedio de la concentración viral a los 15 dpi, mostró una disminución de la concentración del virus en ‘Vyta’, ‘STY3’ y ‘STY4’, después del primer muestreo (Fig. 4b). Sin embargo, los cultivares ‘TX468-RG’ y ‘STY5’, mantuvieron concentraciones poco variable del virus en sus plantas (Fig. 4b).

Similar comportamiento fue observado en las plantas de los cultivares ‘TY52’ y ‘STY6’ ante la infección por TYLCV-IL [CU]. Al igual que en el periodo óptimo, estos cultivares presentaron infecciones latentes a los 15 dpi, las que desaparecieron a los 30 y 45 dpi períodos durante el cual, solo se observaron síntomas ligeros en sus plantas (Fig. 4a). El contenido del ADN viral detectado, para estas tres etapas del muestreo, fue muy estable para las plantas de ‘TY52’ e inferior al valor promedio de  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  sin embargo, para ‘STY6’ los valores promedio oscilaron entre  $0,74 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  y  $1,3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de ADN viral, respectivamente (Fig. 4b).

Nuevamente las plantas de los cultivares ‘H24’ y ‘L7’ fueron asintomáticas (Fig. 4a). Sus folíolos apicales mantuvieron el color verde oscuro, característico de las hojas de las plantas sanas. Esta ausencia de síntomas se mantuvo durante toda la dinámica del muestreo y se correspondió con la no aparición de señales en las placas de hibridación relacionadas con posibles indicios de replicación del ADN viral (Fig. 4b) evidenciando, una vez más, el fenotipo inmune de estos cultivares a TYLCV-IL [CU].

De manera general, para este período de evaluación se identificaron cinco cultivares susceptibles (‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘STY7’, ‘Campbell 28’ y ‘STY1’), uno más que en el período óptimo de siembra, siete cultivares resistentes (‘Vyta’, ‘TY52’, ‘TX468-RG’,

‘STY3’, ‘STY4’, ‘STY5’ y ‘STY6’) y dos cultivares inmunes (‘H24’ y ‘L7’) notándose, además, que a partir de los 30 días después de realizada la inoculación se determinó el total de cultivares susceptibles, dos más (‘STY2’ y ‘STY7’) que los observados en los primeros 15 días después de inoculadas las plantas (Fig. 4).

Como se puede observar en las figuras 3 y 4, durante el período de siembra primavera-verano se observó una mayor rapidez en la aparición y severidad de los síntomas (Fig. 4a), siendo más tardíos durante el período óptimo de siembra para el cultivo (Fig. 3a). Estos contrastes en la severidad de los síntomas y acumulación viral, durante ambos períodos de muestreo, coincidieron con los que describieron García y *col.* (2008), en España, al realizar la evaluación (en diferentes estaciones del año y en condiciones controladas), de la resistencia a TYLCV para diferentes accesiones de tomate observando, el mayor desarrollo e intensidad de los síntomas y concentración viral en las plantas durante el período de siembra menos favorable para el cultivo. Estos autores enunciaron que, una eficiencia en las restricciones de la acumulación viral parecía depender de las condiciones ambientales.

Por su parte, Lapidot y *col.* (2006) hicieron alusión a las diferencias que fueron observadas en la sintomatología de las plantas de tomate cuando los ensayos o pruebas de resistencia son realizados en diferentes épocas del año, observando una agresividad mayor durante el período de siembra primavera-verano. Según Navas y *col.* (2011) en este período, las poblaciones del insecto vector son más altas, las condiciones para el desarrollo del cultivo son menos favorables y las afectaciones, en general, más evidentes.

Los resultados obtenidos por Gorovits y *col.* (2007), podrían explicar las diferencias de severidad encontradas para los dos períodos de siembra. Estos autores determinaron, en condiciones controladas, la expresión de diferentes proteínas relacionadas con el estrés (HSP70, HSP60 y HSP90) al inocular materiales susceptibles y resistentes a TYLCV con el insecto vector (mosca blanca con ausencia o presencia del virus) y sin él. Ellos determinaron, por inmunodetección, la ausencia de bandas de HSP70 en los materiales susceptibles después de los 60 dpi y de HSP60 y HSP90 entre 10 y 15 días después de la

inoculación, hecho asociado al desarrollo acelerado de los síntomas en los cultivares susceptibles.

Según Gorovits y Czosnek (2007), estas proteínas han estado relacionadas con la respuesta de tolerancia a las altas temperaturas, elemento que pudiera explicar las diferencias entre los síntomas mostrados por los cultivares evaluados durante las fechas en que se realizaron los experimentos, lo que indica que la mayor severidad y rapidez en la aparición de los síntomas en los cultivares susceptibles podría estar relacionado con la actividad de las proteínas descritas anteriormente.

Por otro lado, los trabajos de Boevink y Oparka (2005) describieron la función que desempeña la proteína HSP70 en el movimiento del virus célula a célula a través de los plasmodesmos. Esta función posibilita que el virus se mueva rápidamente y llegue a las células acompañantes del parénquima floemático para ser transportado por el tejido conductor hacia toda la planta (movimiento a larga distancia) logrando una invasión total del hospedante.

Atendiendo al criterio empleado en la investigación para discernir entre susceptibilidad y resistencia, se identificaron un total de cuatro cultivares susceptibles ('PIMHIR', 'STY2', Campbell 28' y 'STY1'), dos cultivares inmunes ('H24' y 'L7'), siete cultivares resistentes ('Vyta', 'TY52', 'TX468-RG', 'STY3', 'STY4', 'STY5' y 'STY6'), y un cultivar con comportamiento variable ('STY7') en la expresión de los síntomas durante las evaluaciones realizadas para la severidad y acumulación viral, en los dos períodos de siembra (Fig. 3 y 4).

En cuanto a los controles susceptibles, los resultados obtenidos en 'Campbell 28' corroboraron la alta susceptibilidad de este cultivar, que fue descrita anteriormente por Piñón y Gómez (2003) y Gómez y *col.* (2004), durante la evaluación-selección de híbridos y nuevas líneas resistentes a TYLCV-IL [CU], adaptadas a las condiciones del trópico cubano.

Por su parte, Lapidot y *col.* (2006) en la evaluación de diferentes cultivares para la conformación de una escala universal de severidad para el TYLCV, propusieron el empleo de 'STY1' como control susceptible. Este cultivar alcanzó los valores máximos

de síntomas durante los diferentes períodos de siembras en que fueron realizados los experimentos y ha sido utilizado desde 1997 como control positivo para el virus por el grupo de mejoramiento del *Volcani Center*, en Israel, demostrando también su utilidad como control susceptible ante el aislado cubano de TYLCV en este trabajo.

Cabe significar que, el método de inoculación “en masa” utilizado en estos experimentos, garantizó la inoculación efectiva de todos los materiales, lo cual se evidencia en la reacción de los controles susceptibles que alcanzaron el máximo valor de severidad en la escala y un alto contenido de ADN viral. A pesar de que se describen en la literatura trabajos sobre un nuevo método de inoculación “en jaula”, para garantizar la infección en un 100% de las plantas, utilizándose un número menor de moscas blancas (Inoue y *col.*, 2007), el método de inoculación “en masa”, si bien no garantiza una inoculación controlada de forma individual, tiene la ventaja de ser lo más parecido a la inoculación en condiciones naturales de infestación por el vector.

Los cultivares ‘PIMHIR’ y ‘STY2’, se comportaron como susceptibles ante el aislado cubano de TYLCV. Estos materiales presentaron valores promedio de 2 o por encima de este, según la escala de severidad, en algunas de las evaluaciones realizadas durante la dinámica del muestreo (Fig. 3a y 4a). Estos coincidieron, a su vez, con los valores promedio máximos de concentración viral (Fig. 3b y 4b) para los dos períodos que fueron evaluados.

La condición susceptible de ‘STY2’ se correspondió con lo informado por Lapidot y *col.* (2006), durante el tamizaje realizado a una serie de genotipos resistentes al aislado de TYLCV-IL, en el que presentó valores promedio de severidad por encima de 3 y más de un 45% de las plantas evaluadas mostraron los síntomas típicos de la enfermedad.

En cambio, ‘PIMHIR’ fue un material obtenido a partir de *S. pimpinellifolium*, seleccionado por la resistencia que mostró ante los aislados virales de TYLCV que prevalecieron en Francia y parte de Europa (Laterrot, 1995). Posteriormente, los trabajos desarrollados por Pérez y *col.* (2007a), corroboraron los resultados enunciados por Laterrot, utilizando a ‘PIMHIR’ como control resistente ante el aislado suave de Israel (TYLCV-Mld [IL]) (Fauquet y *col.*, 2008), que afectaba al cultivo en España. Los

resultados expuestos en este trabajo evidenciaron que la resistencia de este cultivar, anteriormente informada, fue vencida frente al TYLCV-IL [CU].

Otros estudios realizados con ‘PIMHIR’ mostraron también su susceptibilidad ante otras especies de begomovirus presentes en el Nuevo Mundo (Mejía y *col.*, 2005). Generalmente, los programas de mejoramiento genético a TYLCV cuya fuente de resistencia proviene de la especie silvestre *S. pimpinellifolium*, no han sido de los más exitosos por los niveles de susceptibilidad que han presentado los materiales obtenidos ante otras especies de begomovirus (Ji y *col.*, 2007b).

En la actualidad, existen pocas fuentes de resistencia utilizadas en cultivares comerciales para el control de TYLCV. Vidavsky y *col.* (2006), en un estudio dialéctico realizado a partir de la combinación entre diversas fuentes de resistencia a begomovirus enunciaron que, los programas de mejoramiento genético de tomate, para estos patógenos, se han apoyado en el aprovechamiento de la resistencia que proviene de las especies silvestres *S. chilense*, *S. peruvianum* y *S. habrochaites* por presentar los niveles más elevados de resistencia.

Los cultivares resistentes, cuya fuente de resistencia provino de la especie silvestre *S. chilense* (‘Vyta’ y ‘TY52’) (Zamir y *col.*, 1994; Gómez y *col.*, 2004), mantuvieron esa condición frente al aislado cubano de TYLCV. De los dos cultivares evaluados, ‘TY52’ presentó valores promedio de severidad de 1, según la escala de síntomas para ambos períodos de evaluación, además de presentar infecciones latentes durante los primeros 15 días después de la inoculación. Las plantas del cultivar ‘Vyta’ presentaron una sintomatología poco perceptible con valores promedio de severidad que se mantuvieron cercanos a 1, durante ambos períodos de siembra (Fig. 3a y 4a). La sintomatología de ambos cultivares se correspondió con valores promedio de contenido viral que fueron menores que  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , para el período de siembra óptimo e iguales y algo superiores a  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  durante el período de siembra primavera-verano (Fig. 3 y 4).

El cultivar ‘Vyta’ constituye, actualmente, la fuente de resistencia más utilizada para contrarrestar los efectos provocados por el complejo mosca blanca-geminivirus que viene afectando al país desde la década de los 90 (González y Valdés, 1995; Quiñones y

col., 2007). Sin embargo, Verdecia y col. (2003) describieron la presencia de síntomas ligeros en hojas de las plantas de 'Vyta' durante evaluaciones realizadas en las áreas productoras de la región oriental del país. Esta zona de Cuba se caracteriza por presentar elevadas temperaturas que favorecen la población del vector y un desarrollo acelerado de la enfermedad. Investigaciones desarrolladas por Martínez y col. (2009) detectaron que, además del factor temperatura, la siembra continua de tomate y otros cultivos hospedantes de la mosca blanca y/o begomovirus causan tales afectaciones, lo que puede provocar la ruptura de la resistencia.

Los resultados obtenidos en las evaluaciones de 'TY52' se correspondieron con los descritos por Ji y col. (2007b) y Barbieri y col. (2010) en los diferentes estudios realizados por ellos, encaminados a la búsqueda de resistencia a los aislados de TYLCV de Serdeña e Israel. Zamir y col. (1994) explicaron el carácter resistente de 'TY52', describiendo la presencia del gen *Ty-1*, y su relación con el impedimento del movimiento del virus a corta distancia (célula-célula).

El cultivar 'STY3' presentó siempre un comportamiento resistente en ambos períodos de siembra, aunque con valores promedio de severidad y contenido viral más bajos durante el período de siembra óptimo del cultivo (Fig. 3). Una respuesta diferente fue obtenida por Lapidot y col. (2006), cuando lo evaluaron frente al aislado israelita de TYLCV en condiciones de campo. Los valores promedio de severidad fueron diferentes en el verano (3,2 de una escala de 4) con respecto al invierno (1,4 de una escala de 4), comportándose como un cultivar susceptible durante el período de siembra menos favorable para el desarrollo del cultivo.

Por otro lado, los cultivares 'TX468-RG' y 'STY5', de igual procedencia genética (híbrido comercial 'Tyking'), mostraron resistencia a TYLCV-IL [CU]. Anteriormente, ya había sido informada la resistencia de estos cultivares al aislado israelita de TYLCV por Lapidot y col. (2006) y García y col. (2008). En el caso de 'TX468-RG', fue seleccionado en Brasil por su alta resistencia a *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (begomovirus bipartito) y es el único de los cultivares evaluados cuya resistencia está determinada por un gen recesivo (*tcm-1*) (Giordano y col., 2005a). Estos resultados lo convirtieron en un material interesante por el espectro de resistencia que mostró a

begomovirus de genoma mono y bipartitos presentes en el Nuevo y en el Viejo Mundo (García y col., 2008).

Las plantas del cultivar ‘STY5’ presentaron síntomas poco visibles en sus hojas apicales, los que se correspondieron con el grado 1 o por debajo de este en la escala de evaluación, para ambos períodos de siembra (Fig. 3a y 4a). Estos resultados, en combinación con los bajos valores de contenido viral (Fig. 3b y 4b) demostraron el carácter resistente de este cultivar ante el aislado cubano de TYLCV que circula y prevalece en los agroecosistemas de nuestro país (Martínez y col., 2006). Dichos resultados fueron muy semejantes a los alcanzados por Lapidot y col. (2006) cuando evaluaron a ‘STY5’ frente el aislado israelita de TYLCV, el cual es un 98% similar al aislado cubano (Martínez y col., 1996), en condiciones no controladas de inoculación (a campo abierto) y presentaron valores promedio de severidad de 1,3 para el verano y de 0,5 para el período de invierno.

Otro de los aprovechamientos de la resistencia derivada de ‘Tyking’, fue el realizado a partir de un grupo de líneas (FLA 478, FLA 505, FLA 591, FLA 653, FLA 658 y FLA 699), obtenidas en la Florida, por el Dr. Scott (Ji y col., 2007b). Estas líneas presentaron una respuesta resistente a *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) (virus bipartito) y en una de ellas (FLA 653), se identificó el alelo recesivo *tgr-1* que afectaba el movimiento viral (Bian y col., 2007). Los trabajos de Ji y col. (2007b), enunciaron a la especie *S. peruvianum* como la posible fuente de resistencia de la cual pudiera ser originaria la de ‘Tyking’.

La resistencia de los cultivares ‘STY6’ y ‘STY7’ provino de la especie silvestre *S. peruvianum*, son conocidos en la literatura internacional como ‘TY197’ y ‘TY172’, respectivamente (Lapidot y col., 1997; Friedmann y col., 1998). ‘STY7’ presentó, solamente, síntomas evidentes de la enfermedad durante el período de siembra primavera-verano, los cuales fueron ascendentes y superaron el valor promedio de 2 en la escala a los 30 y 45 dpi, siendo sus contenidos virales promedio por encima de los 2 ng.μL<sup>-1</sup> (Fig. 4). Sin embargo, una sintomatología suave se expresó en todas sus plantas para el período óptimo de siembra del cultivo, acompañada de concentraciones virales promedio por debajo de 1ng.μL<sup>-1</sup> (Fig. 3). Estas diferencias se deben a que las plantas

del cultivar ‘STY7’ que se evaluaron durante el período de siembra primavera-verano presentaron cierta segregación, lo cual explicó este comportamiento variable.

Esta respuesta en ‘STY7’ fue diferente a la descrita por Lapidot y *col.* (2006), quienes informaron valores de severidad cercanos a cero para la escala que emplearon durante la evaluación en dos períodos de siembras contrastantes para el cultivo del tomate en Israel. Por otro lado, el cultivar ‘STY7’ ha sido de las fuentes de resistencia más utilizadas por diferentes grupos de mejoramiento para begomovirus, a nivel internacional, por la ausencia de síntomas y bajas concentraciones virales ante diferentes especies de begomovirus que afectan al cultivo (Bian y *col.*, 2007; Anbinder y *col.*, 2009; Piñón, 2009).

En el caso del cultivar ‘STY6’, los resultados de las evaluaciones (Fig. 3 y 4) revelaron solo la presencia de síntomas a partir de los 30 dpi, sin alcanzar valores promedio de 2 durante el muestreo. Este cultivar, también ha sido reconocido por su comportamiento resistente ante diferentes aislados y especies de begomovirus presentes en el Viejo y el Nuevo Mundo (Santana y *col.*, 2001; Mejía y *col.*, 2005; Pérez y *col.*, 2005; Czosnek y *col.*, 2007).

Lapidot y *col.* (2000), plantearon la existencia de una resistencia con dominancia parcial en el cultivar ‘STY6’, en el que al menos tres genes estuvieron involucrados, elemento que dificultaría su uso en los programas de mejoramiento genético para la enfermedad. Los trabajos de Vidavsky y *col.* (2008) enunciaron a estos cultivares (‘STY6’ y ‘STY7’), como fuentes de resistencias a emplear para la piramidación de genes y en la obtención de híbridos resistentes con buenos rendimientos, al combinarlos con materiales cuya fuente de resistencia a TYLCV, provengan de la especie silvestre *S. habrochaites*.

La no presencia de síntomas y ausencia total de contenido viral en plantas de los cultivares ‘H24’ y ‘L7’ (Fig. 3 y 4) evidenciaron el carácter inmune expresado por estos materiales, ante la inoculación con el insecto vector durante la experimentación.

Un comportamiento resistente o susceptible del cultivar ‘H24’ también, ha sido descrito por diferentes grupos de trabajos cuando lo utilizaron en la búsqueda de fuentes de resistencia a diferentes especies o aislados de begomovirus (mono o bipartitos), que

afectaban las producciones del cultivo a nivel internacional (Mejía y *col.*, 2005; AVRDC, 2006; Chomdej y *col.*, 2007; Green y Shanmugasundarm, 2007; Azizi y *col.*, 2008; Barbieri y *col.*, 2010), en cambio, frente al aislado cubano mostró inmunidad.

El fenotipo inmune de ‘L7’ se relacionó con los resultados obtenidos en el cultivar ‘H24’. Este es un material que proviene de un cruzamiento en el que uno de los progenitores fue ‘H24’ y se seleccionó en Nicaragua por su comportamiento resistente ante las especies de begomovirus bipartitos existentes en ese país (Jiménez y *col.*, 2010).

#### **4.1.2 Cultivares inoculados con TYLCV-IL [CU], por agroinoculación.**

Los resultados de la agroinoculación durante la dinámica del muestreo se detallan en la tabla 5.

De manera general, los valores promedio de severidad expresados por cada cultivar, a los 15 días después de realizada la inoculación, fueron muy bajos (por debajo de 1 en la escala), lo que se relacionó con la ausencia de síntomas en algunas de las plantas agroinoculadas con TYLCV-IL [CU].

Este retardo en la severidad de los síntomas difirió con los resultados expuestos por Díez y *col.* (2000) y Pérez y *col.* (2005). Estos autores, realizando agroinoculaciones con otros aislados virales de TYLCV detectaron que, al menos, los controles susceptibles presentaron los valores máximos de severidad (rizado y amarilleamiento de los folíolos, enanismo) pasados los primeros 15 días después de inoculadas las plantas.

Esta demora en la aparición de los síntomas, pudo estar condicionada por la propia biología molecular que comprende el proceso de infección que desencadena *Agrobacterium tumefaciens* al colonizar la planta. En estos eventos, para lograr la expresión de síntomas de TYLCV fue necesario que la región T del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, que contenía el genoma del TYLCV-IL [CU], se integrara al genoma de la célula vegetal y comenzara el proceso de replicación viral (Andrade y *col.*, 2003).

Sin embargo, a pesar de los bajos valores promedio de severidad expresados por todos los cultivares a los primeros 15 días después de la agroinoculación con TYLCV-IL [CU], los resultados de la hibridación mostraron replicación viral en la gran mayoría de las plantas de estos, excepto para ‘H24’ y ‘L7’ (Fig. 5), detectándose infecciones

latentes en algunas de las plantas de ‘Vyta’, ‘TX468-RG’, ‘STY3’, ‘STY4’ y ‘STY5’ (Tabla 5 y Fig. 5).

**Tabla 5.** Valores promedio de severidad de la enfermedad expresados durante la dinámica del muestreo por los cultivares evaluados ante la agroinoculación de TYLCV-IL [CU].

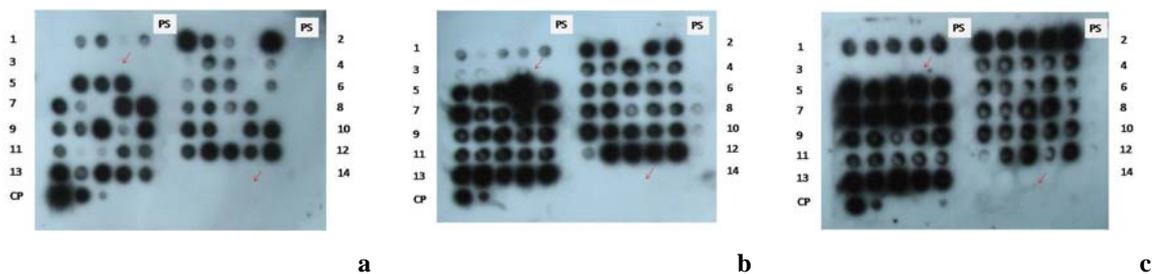
Cultivar	Severidad <sup>1</sup>		
	15 dpi	30 dpi	45 dpi
‘Vyta’	0	0	0,1
‘TY52’	0,4	0,2	0,2
‘H24’	0	0	0
‘L7’	0	0	0
‘TX468-RG’	0	0,2	0,8
‘PIMHIR’	0,1	2	2,1
‘STY2’	0,4	2	2
‘STY3’	0	0,2	0,8
‘STY4’	0	0,6	0,9
‘STY5’	0	0,2	0,2
‘STY6’	0,2	2	2
‘STY7’	0,6	2,9	3,3
‘Campbell 28’	0,4	2	2,4
‘STY1’	0,4	2,1	3

<sup>1</sup>: escala de severidad propuesta por Lapidot y *col.* (2006) para TYLCV, donde 0: planta sin síntomas; 1: planta con síntomas de amarilleamiento ligero en el margen de los folíolos de las hojas apicales; 2: planta con síntomas de amarilleamiento y encrespamiento menor de los folíolos apicales; 3: planta con gran rango de síntomas de amarilleamiento de las hojas, encrespamiento y acucharamiento, con alguna reducción del tamaño, pero la planta sigue creciendo; 4: planta con síntomas de amarilleamiento severo y retraso del crecimiento, encrespamiento y acucharamiento, se detiene el crecimiento de la planta.

En este sentido, se observó un aumento progresivo de la enfermedad a los 30 y 45 días después de la inoculación, sin llegar a ocurrir la muerte de las plantas. Los valores promedio de severidad, para estas fechas de evaluación, se incrementaron entre los cultivares evaluados (Tabla 5), así como el contenido viral y número de plantas que replicaron virus (Fig. 5) exceptuando, nuevamente, las plantas de los cultivares ‘H24’ y ‘L7’.

De manera general, se identificaron seis cultivares susceptibles (‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘STY6’, ‘STY7’, ‘Campbell 28’ y ‘STY1’), ocho resistentes (‘Vyta’, ‘TY52’, ‘TX468-

RG', 'STY3', 'STY4' y 'STY5') y dos inmunes ('H24' y 'L7'), durante la dinámica de las evaluaciones realizadas para la severidad y contenido viral (Tabla 5 y Fig. 5). Los cultivares considerados como susceptibles a los 30 dpi presentaron valores promedio de severidad mayores que los expresados por los cultivares que fueron considerados resistentes.



**Figura 5.** Detección del genoma de TYLCV-IL [CU] mediante HAN radiactiva, en plantas (cinco) de los cultivares 'Vyta' (1), 'PIMHIR' (2), 'H24' (3), 'TY52' (4), 'Campbell 28' (5), 'TX468-RG' (6), 'STY1' (7), 'STY2' (8), 'STY3' (9), 'STY4' (10), 'STY5' (11), 'STY6' (12), 'STY7' (13), 'L7' (14), mediante el ensayo *dot blot*. Sonda radiactiva: fragmento de la región intergénica de TYLCV-IL [CU]. Las muestras de ADN se extrajeron de cada planta a los 15 (a), 30 (b) y 45 (c) días post-inoculación. CP (curva patrón): cantidades conocidas ( $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  y  $0,01 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) del genoma total de TYLCV-IL [CU] clonado en el plásmido pZ200 (Fuentes y *col.*, 2006). PS: plantas control de cada cultivar sin inocular.

El carácter susceptible de los cultivares 'PIMHIR', 'STY2', 'Campbell 28' y 'STY1' coincidió con el expresado en los experimentos de inoculación con mosca blanca, aspectos que fueron discutidos en el epígrafe anterior y que demuestran el empleo acertado de los cultivares 'Campbell 28' y 'STY1' como controles susceptibles a TYLCV-IL [CU].

Resultó inesperado la susceptibilidad expresada por las plantas de los cultivares 'STY6' y 'STY7' frente al aislado cubano de TYLCV, 98% similar al aislado israelita (Fauquet y *col.*, 2008). Estos son cultivares que han sido propuestos para el mejoramiento genético a TYLCV, por los grupos de investigación de Israel, debido a la respuesta resistente que mostraron, no solo al aislado de este país (Lapidot y *col.*, 2006), sino a otros begomovirus con genomas bipartitos que se encuentran en las regiones productoras de tomate de América Central (Mejía y *col.*, 2005).

En este sentido, la susceptibilidad de estos cultivares cuando la inoculación estuvo mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, evidenció la ruptura de ciertas barreras de resistencia que estos pudieran desarrollar cuando la inoculación se realiza con el insecto vector. Algunos fitomejoradores han cuestionado este tipo de inoculación, pues se “saltan” los mecanismos de evasión que se pueden establecer entre el insecto vector y la arquitectura o los compuestos químicos del hospedante (Picó y col., 2001; Niks y Lindhout, 2004), además de considerar a *A. tumefaciens* como otro patógeno dentro de la planta agroinoculada (Lapidot y col., 2007). Se ha planteado, además, sobre la inactivación de los genes de resistencia del hospedante, los que probablemente se expresen durante las primeras fases de la infección, inmediatamente después que el virus ha sido inoculado por el insecto vector y antes de comenzar la acumulación del ADN viral dentro de las células inoculadas (Kheyr y col., 1994; Picó y col., 2001).

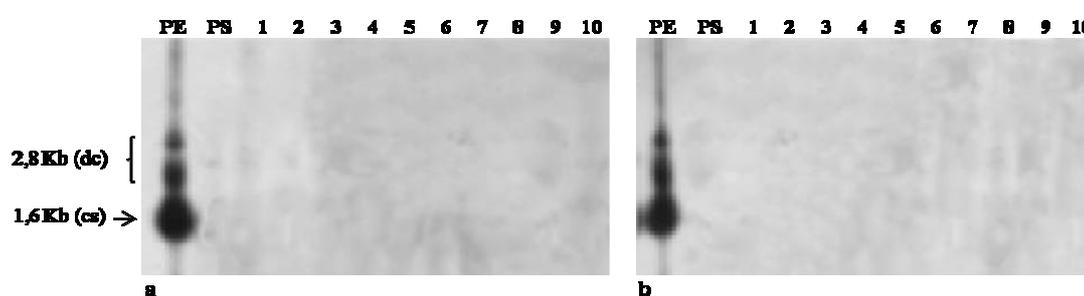
Sin embargo, a pesar de emplear este método de inoculación, se observó un fenotipo resistente en los cultivares ‘Vyta’, ‘TY52’, ‘TX468-RG’, ‘STY3’, ‘STY4’ y ‘STY5’, el cual se correspondió con el obtenido en la experimentación con mosca blanca.

En este caso, los valores promedio de severidad estuvieron por debajo de 1, según la escala de síntomas utilizada (Tabla 5) y el contenido de ADN viral en las plantas resultó con una concentración promedio por debajo de los 10 ng.μL<sup>-1</sup> durante la dinámica del muestreo (Fig. 5). Estos resultados pusieron de manifiesto que pueden existir mecanismos relacionados con la resistencia al patógeno en estos cultivares que detuvieron el proceso infectivo. En una revisión desarrollada por Byoung y col. (2005), en el tema de la genética para la resistencia a virus de plantas, se describe la presencia de proteínas de la planta hospedante que dificultan los procesos de movimiento del virus a corta y larga distancia, lo cual se relaciona con niveles bajos de detección del virus en el hospedante y la demora en la aparición de los síntomas.

La no presencia de síntomas y ausencia total de contenido viral en plantas de los cultivares ‘H24’ y ‘L7’ (Fig. 5 ) corroboraron el carácter inmune expresado por estos materiales durante los experimentos de inoculación con mosca blanca (sección 4.1.1). Este tipo de respuesta es también llamada por los términos resistencia extrema o

resistencia celular, la cual ocurre cuando el virus no se puede replicar en la célula una vez inoculado (Fraser, 1990).

Los resultados del análisis de HAN tipo *southern blot* (Fig. 6) confirmaron los resultados de inmunidad a TYLCV-IL [CU] detectados en los cultivares ‘H24’ y ‘L7’ (secciones 4.1.1 y 4.1.2). Las plantas evaluadas de estos cultivares a los 15 y 45 días después de la inoculación con *A. tumefaciens* no presentaron las bandas de cadena simple (1,6 Kb) ni las de la forma replicativa del virus (2,8 Kb), como se observó en la plantas enfermas del control susceptible ‘Campbell 28’ (Fig. 6).



**Figura 6.** Detección del genoma de TYLCV-IL [CU] mediante HAN radiactiva, en plantas (cinco) de los cultivares ‘H24’ (carriles del 1 al 5) y ‘L7’ (carriles del 6 al 10), mediante el ensayo *southern blot*. Sonda radiactiva: fragmento de la región intergénica de TYLCV-IL [CU]. Las muestras de ADN se extrajeron de cada planta a los 15 (a) y 45 (b) días post-inoculación. PE: ADN de una planta de tomate infectada del control susceptible. PS: ADN de una planta no infectada del control susceptible.

La inmunidad expresada por ‘H24’ y ‘L7’ constituyó el primer informe en fuentes naturales ante el aislado de Cuba. La inmunidad en tomate a TYLCV-IL [CU] solo fue notificada, anteriormente, por Fuentes y *col.* (2006), en plantas del cultivar ‘Campbell 28’ genéticamente transformadas, a partir de una construcción genética asociada al gen de la proteína C<sub>1</sub>, que indujo el silenciamiento génico en la replicación temprana de TYLCV.

La forma replicativa, de dos cadenas de ADN circular, es activa para la transcripción e inmediatamente se expresan los genes tempranos (*c1*, *c2*). Después de sintetizada la proteína Rep, la replicación para la generación de la progenie y la transcripción ocurren de manera simultánea y probablemente en el nucleolo (Rojas y *col.*, 2001). El producto

del gen *ac1* en los virus bipartitos, o su homólogo en los monopartitos es la única proteína viral esencial para la replicación (Elmer y *col.*, 1988).

De manera general, y atendiendo a los resultados obtenidos por ambos métodos de inoculación (con el insecto vector y con *Agrobacterium tumefaciens*), se seleccionaron a los cultivares ‘Vyta’, ‘TY52’, ‘TX468-RG’, ‘STY3’, ‘STY4’ y ‘STY5’, por su comportamiento resistente a TYLCV-IL [CU] y ‘H24’ y ‘L7’, por su respuesta inmune.

Relacionado con ello, cada método de inoculación tiene sus bondades y limitantes, por lo que el empleo de uno u otro, depende de los intereses y resultados a los que quiera llegar el investigador. Aunque según Bian y *col.* (2007), existe una tendencia a la combinación de ambos métodos, de manera tal que permitan la selección de cultivares inmunes, resistentes, tolerantes o susceptibles, así como para profundizar en el tipo de resistencia. De los dos métodos empleados, la inoculación por mosca blanca resultó ser más sencilla, comparada con la agroinoculación, además de ser el vector natural que transmite el virus en el agroecosistema. Sin embargo, la agroinoculación permitió confirmar que la resistencia y la inmunidad de los cultivares fue dada por genes de resistencia al virus y no por mecanismos de evasión de las plantas al insecto vector.

A nivel internacional, se continúan en la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia a TYLCV (Czosnek y *col.*, 2007). En este sentido, todas las investigaciones han estado dirigidas hacia la exploración en las especies silvestres del género, las cuales albergan el mayor número de genes involucrados con la resistencia o tolerancia a la enfermedad (Maule y *col.*, 2007).

La inmunidad, como el nivel más alto de expresión de la resistencia demostrada por los cultivares ‘H24’ y ‘L7’, reviste interés práctico y teórico, por lo que se desarrolló un ensayo para analizar si esta es heredable y si la expresión está limitada solo a plantas homocigóticas al gen *Ty-2*. Para ello, se analizó la segregación del gen *Ty-2* en plantas F<sub>2</sub> a partir de ‘H24’, por ser esta la fuente primaria de introgresión de este gen, en contraste con la segregación del gen *Ty-1*, de conocida herencia en ‘TY52’.

#### **4.2 Evaluación de la segregación de la resistencia a TYLCV-IL [CU] conferida por los genes de resistencia a begomovirus *Ty-1* y *Ty-2*.**

En el análisis de la segregación de la resistencia (inmunidad) mostrada por el cultivar ‘H24’, transcurridos solo 15 días de la inoculación, el cultivar ‘STY1’, empleado como control susceptible, ya tenía síntomas intensos de la infección por TYLCV (grado 4, valor máximo de la escala), al igual que el cultivar susceptible ‘Amalia’, empleado como progenitor susceptible. La rapidez en la aparición de los síntomas confirmó la ausencia de barreras para la multiplicación y diseminación del virus en la planta hospedante. También, se confirmó la efectividad de la inoculación con TYLCV-IL [CU].

En cambio, el cultivar ‘H24’, empleado como progenitor resistente (gen *Ty-2*), no mostró ninguna de las sintomatologías descritas para la enfermedad (grado 0, valor mínimo de la escala). Sus folíolos apicales mantuvieron el color verde oscuro, característico de las hojas de las plantas sanas y se correspondió con la no detección de contenido viral, al igual que lo mostrado en las secciones **4.1.1** y **4.1.2**. Esta fuente de resistencia ha sido empleada ampliamente en la obtención de cultivares en el programa de mejora de Taiwán (Hanson y *col.*, 2000) y ofrece muy buenas perspectivas para el programa de mejora en el país, no solo por su alta resistencia al aislado cubano de TYLCV, sino también porque se tiene acceso a un marcador confiable al gen *Ty-2* de resistencia a begomovirus.

El otro progenitor resistente, el cultivar ‘TY52’ que porta el gen de resistencia *Ty-1*, mostró solo un ligero amarilleamiento de los folíolos apicales, similar a la descripción del grado 1 de la escala, valor que se mantuvo hasta 30 días después de la inoculación, siendo bajo el contenido de ADN viral ( $0,06 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). Este gen, fue el primero que se obtuvo para la resistencia a TYLCD, luego de ser introgresado a *S. lycopersicum*, desde *S. chilense* (Zamir y *col.*, 1994), y el portador de la resistencia de los primeros híbridos resistentes de tomate que salieron al mercado, posiblemente, ha sido el más explotado comercialmente por el espectro de resistencia que ha presentado frente a varias especies de begomovirus en el mundo (Vidavsky y *col.*, 2006; Ji y *col.*, 2007b).

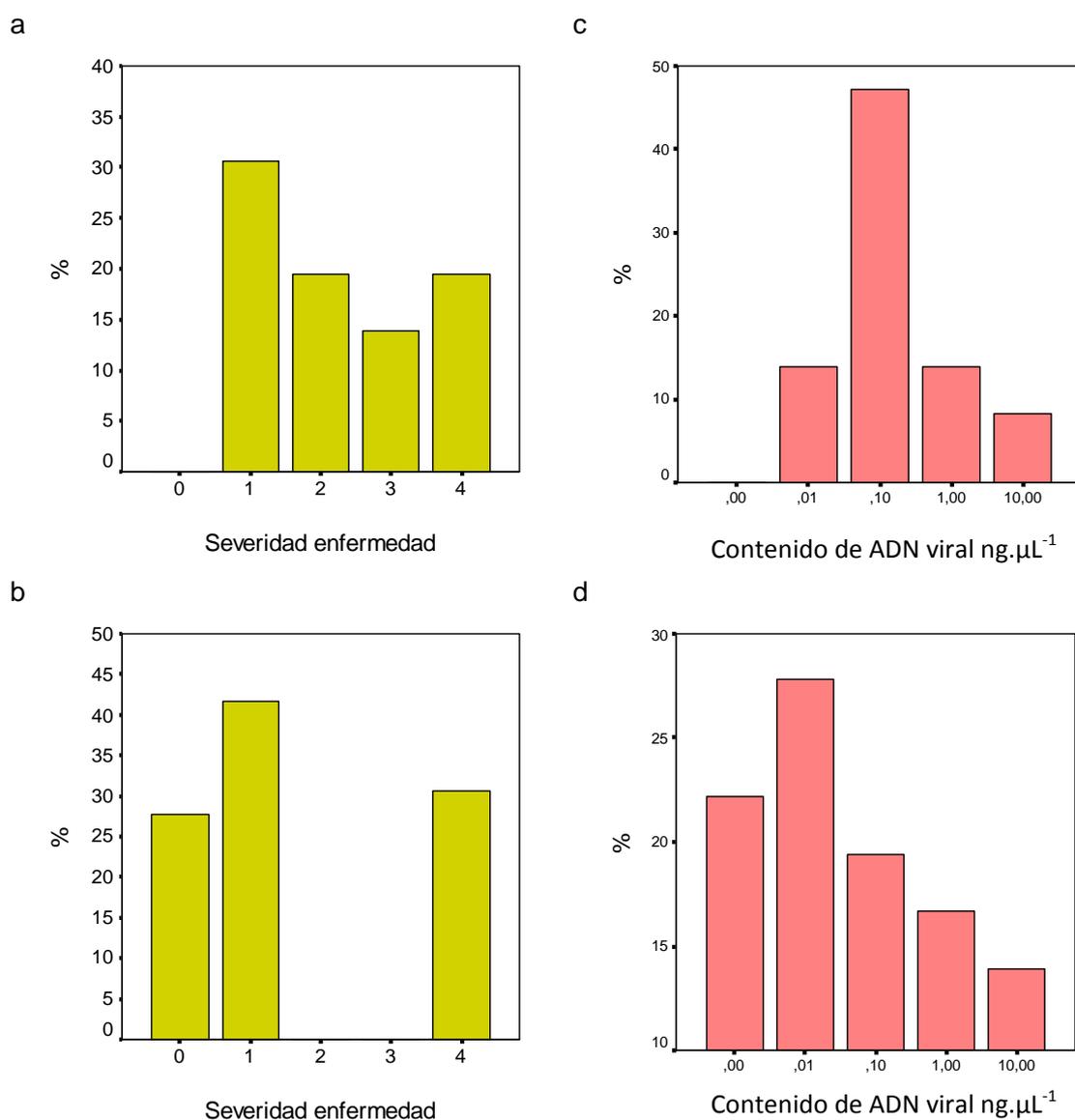
Al analizar la sintomatología de la enfermedad en las plantas  $F_2$ , segregantes para los genes  $Ty-1$  y  $Ty-2$  (TY-1 $F_2$  y TY-2 $F_2$ , respectivamente), se observaron diferencias en la expresión fenotípica de la resistencia. Las plantas segregantes para  $Ty-1$  tuvieron la sintomatología que corresponde a los valores desde 1 a 4 grados en la escala (Fig. 7a), mientras que las plantas segregantes para  $Ty-2$ , mostraron los síntomas correspondientes a los valores 0, 1 y 4 grados de la escala (Fig. 7b).

Si se tiene en cuenta que el gen  $Ty-1$  confiere una resistencia tipo dominante parcial (Zamir y col., 1994; Pérez y col., 2008), esto explica los diferentes niveles de expresión de la resistencia y susceptibilidad en la segregación de la  $F_2$ , que abarca todos los valores de la escala, excepto el grado 0. En cambio, las plantas segregantes para  $Ty-2$  tuvieron los dos fenotipos parentales, 0 y 4, con una frecuencia de 25% cada uno, y solamente uno adicional, el grado 1, que deberá corresponderse con los genotipos heterocigóticos  $F_1$ . Scott (2007) se refirió también a una resistencia dominante, de parcial a completa, en el cultivar 'H24' al aislado de Taiwán de TYLCV, en cambio presentó algunos síntomas de virosis ante el aislado de la India, lo cual demuestra diferencias en la respuesta de resistencia de este cultivar en las dos localidades.

Por su parte, el análisis de la frecuencia de las plantas  $F_2$ , de acuerdo a la concentración de ADN viral (Fig. 7c y d), reveló que la distribución no fue igual a los síntomas, por lo que pudiera plantearse que la respuesta de la planta ante el virus sigue un patrón diferente al de la sintomatología de la enfermedad. También, este carácter es cuantitativo, mientras que la sintomatología es cualitativa, es por ello que se estableció el rango de variación del contenido de ADN que le correspondió a cada uno de los valores discretos de la escala, con el fin de tener en cuenta los dos caracteres para seleccionar las plantas resistentes en la  $F_2$ .

Aquí se pudo apreciar que el rango de valores de los contenidos de ADN viral se correspondió con cada valor de la escala (Tabla 6), independiente del origen genético de las plantas, de modo que, aquellas con valor 1 y 4 de la escala tuvieron rangos semejantes, ya sean estas de la población TY-2 $F_2$  o de la TY-1 $F_2$ . En la figura 8 se muestra la imagen de una de las placas obtenidas mediante la HAN tipo *dot blot*, donde se destaca la ausencia total de mancha para aquellas plantas de la población TY-2 $F_2$  con

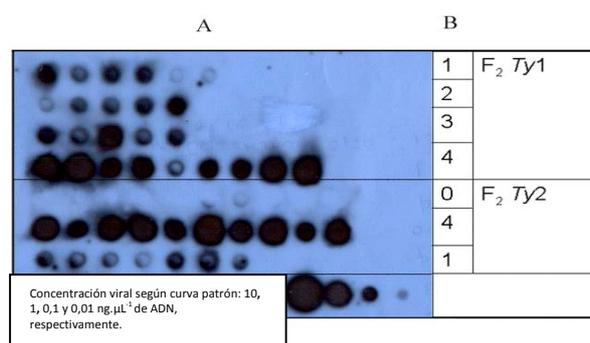
valor 0, lo que evidenció que heredaron la ausencia de síntomas y de replicación viral de su parental resistente, el cultivar 'H24'. Se observaron pequeñas manchas para las plantas con severidad 1, lo que evidencia que la resistencia no fue de dominancia completa, sino parcial.



**Figura 7.** Frecuencia (porcentaje) de plantas F<sub>2</sub> segregantes para los genes de resistencia *Ty-1* y *Ty-2* atendiendo al contenido de ADN viral (clases con valores medios de 0, 0,01, 0,1, 1 y 10 ng.μL<sup>-1</sup>) y la severidad de la enfermedad (clases con valores de escala 0-4), 30 días después de inoculadas con TYLCV-IL [CU]: a y c, plantas F<sub>2</sub> segregantes para *Ty-1*: b y d, plantas F<sub>2</sub> segregantes para *Ty-2*.

**Tabla 6.** Rango de valores del contenido de ADN viral, estimado mediante hibridación tipo *dot blot*, en hojas jóvenes de plantas de tomate F<sub>2</sub> segregantes para los genes de resistencia *Ty-1* y *Ty-2*, con diferente severidad de la enfermedad (escala de 0-4), luego de 30 días de inoculadas con TYLCV-IL [CU].

Población F <sub>2</sub> segregante para el gen de resistencia <i>Ty-1</i>				Población F <sub>2</sub> segregante para el gen de resistencia <i>Ty-2</i>			
Severidad	Contenido ADN viral (ng.μL <sup>-1</sup> )			Severidad	Contenido ADN viral (ng.μL <sup>-1</sup> )		
	Media	Mín.	Máx.		Media	Mín.	Máx.
0	—	—	—	0	0	0	0
1	0,08	0,01	0,1	1	0,05	0,01	0,1
2	0,1	0,01	0,1	2	—	—	—
3	0,3	0,1	1	3	—	—	—
4	4,9	1	10	4	5,1	1	10



**Figura 8.** Evaluación mediante hibridación por *dot blot* de hojas jóvenes de plantas de tomate F<sub>2</sub> segregantes para los genes de resistencia *Ty-1* y *Ty-2*, luego de 30 días pos inoculadas con TYLCV-IL [CU]. Las manchas en las líneas horizontales (A) se corresponde con la severidad de la enfermedad (escala 0-4) (B). En la fila de abajo se muestra la estimación del contenido de ADN viral mediante una curva patrón.

Estamos ante una respuesta heredable de la inmunidad a esta enfermedad viral, que fue descrita para el cultivar ‘H24’ en las secciones 4.1.1 y 4.1.2, mediante dos métodos de inoculación del TYLCV-IL [CU] (por el insecto vector y agroinoculación). En este trabajo se muestra que dicha inmunidad se heredó en, aproximadamente el 25% de las

plantas de la población TY-2F<sub>2</sub>, como se corresponde con una expresión dominante parcial de la resistencia, determinada por el gen *Ty-2*, para el aislado cubano de TYLCV, en homocigosis.

Si se tiene en cuenta que los genotipos homocigóticos resistentes (progenitores) para *Ty-2* y *Ty-1* tuvieron valores de severidad 0 y 1, respectivamente, las plantas a seleccionar en TY-2F<sub>2</sub> y TY-1F<sub>2</sub>, deberán tener esos mismos valores, al ser conveniente seleccionar las plantas homocigóticas, en lugar de las heterocigóticas resistentes. Se recomienda, para el primero seleccionar solamente aquellas plantas con grado 0, y para el segundo, deberán seleccionarse solo las que alcancen el valor 1 en la escala. Con esto, se garantizaría estar seleccionando las plantas resistentes homocigóticas, en lugar de heterocigóticas resistentes, lo cual ahorraría tiempo en la mejora para la resistencia por este método.

La fiabilidad en el empleo de la sintomatología para clasificar o seleccionar por la resistencia de las plantas de tomate ha sido discutida. Con anterioridad, Rom y *col.* (1993) y Lapidot y *col.* (1997) encontraron una correlación positiva entre la severidad de los síntomas y la acumulación de ADN viral, sin embargo, no recomiendan emplear, este último, como un solo indicador de la resistencia. En este trabajo se evaluó la resistencia mediante los dos caracteres, ya que la severidad de la enfermedad indica el daño que ha ocasionado el virus en el crecimiento y desarrollo de la planta, mientras que el contenido de ADN viral refleja la tasa de multiplicación que ha logrado el patógeno a expensas del hospedante.

Estos resultados, también podrían ser de importancia para los países de la región del Caribe los cuales presentan, en la actualidad, serios problemas fitosanitarios con TYLCV, pues años después de su introducción en República Dominicana y Jamaica (Polston y *col.*, 1994; Mc Glashan y *col.*, 1994; Morales y Anderson, 2001), constituye una de las principales amenazas para el cultivo del tomate, causando pérdidas en la producción que provocan el abandono total del cultivo por parte de los productores (Morales, 2010).

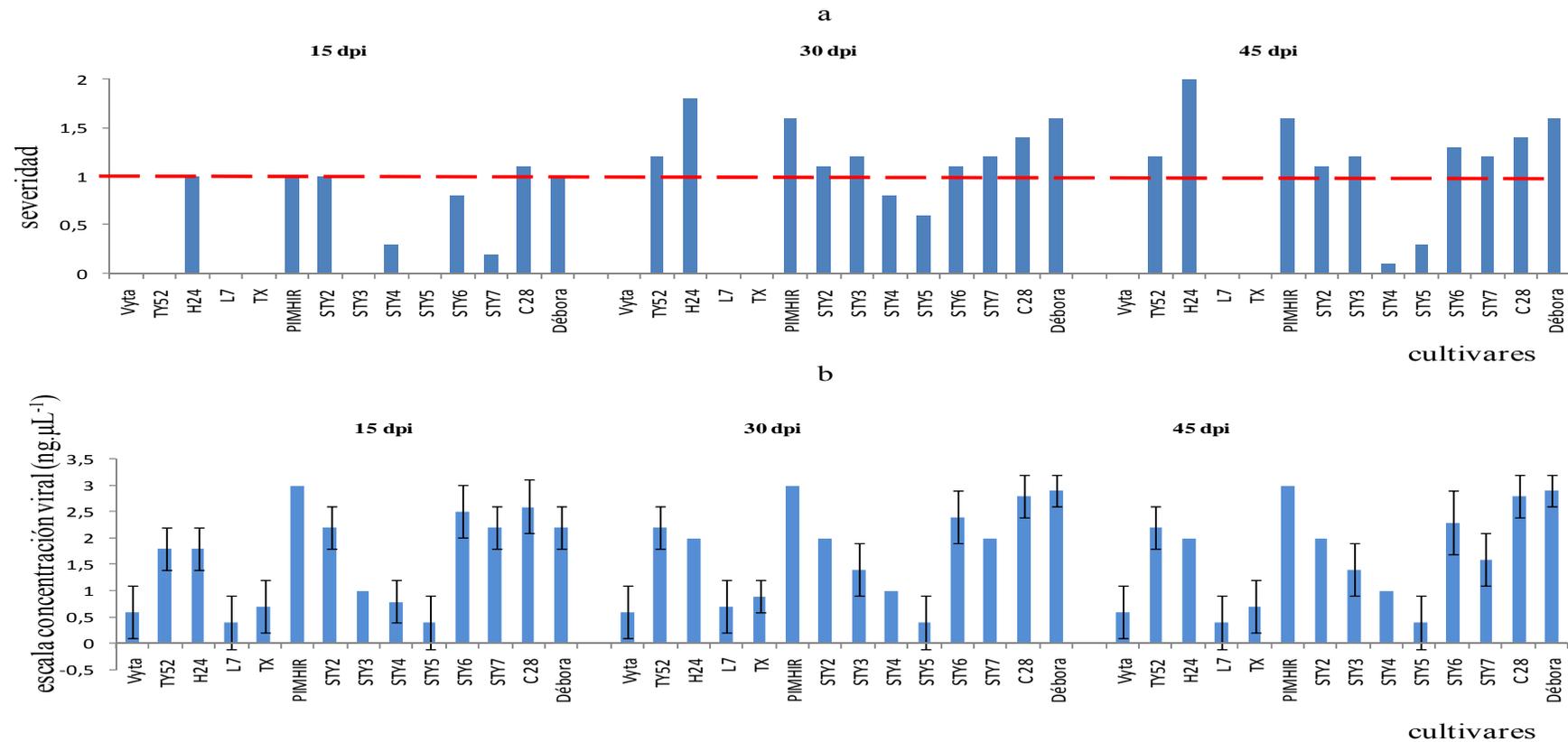
Sin dudas, la información derivada de los estudios realizados con TYLCV-IL [CU] permitió conocer sobre otras fuentes de resistencia al aislado cubano que podrían ser aprovechadas por el programa de mejoramiento genético de tomate para dicha enfermedad. En este sentido, a nivel internacional, diferentes grupos de investigación trabajan por obtener un cultivar que contemple mecanismos de resistencia amplia a begomovirus mono y bipartitos (Hutton y *col.*, 2011) por lo que se hacía necesario conocer el comportamiento de los cultivares evaluados, frente a begomovirus del Nuevo Mundo que presentan genomas bipartitos. Estos tipos de virus constituyen una amenaza para Cuba, ya que en los últimos años se han encontrado infectando arvenses y tomate (Fiallo y *col.*, 2009; 2012b).

### **4.3 Evaluación de cultivares ante aislados de begomovirus bipartitos.**

#### ***4.3.1 Cultivares inoculados con aislados brasileños de ToYSV y ToSRV, por biobalística.***

La figura 9, muestran los valores promedio de severidad y contenido viral detectados, para todos los cultivares, ante la inoculación realizada con ToYSV.

Transcurridos solo 15 días de la inoculación, los cultivares ‘H24’, ‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘Campbell 28’ y ‘Débora’ manifestaron su susceptibilidad. Estos cultivares ya tenían síntomas en sus plantas, que fueron igual a 1, manteniendo un aumento progresivo hasta los 30 y 45 días después de realizada la inoculación (Fig. 9a), correspondiéndose con la presencia de plantas que presentaron una concentración promedio del virus cercana o superior a los 100 ng.µL<sup>-1</sup> de ADN (Fig. 9b).



**Figura 9. a.** Valores promedio de severidad\* expresados por los cultivares en estudio, ante la inoculación por biobalística, para ToYSV.

\*: escala de severidad descrita por Giordano y *col.* (2005b) adaptada a los síntomas característicos de ToYSV, donde 0: planta sin síntomas; 1: planta con manchas cloróticas y epinastía; 2: planta con mosaico severo, epinastía, distorsión foliar y reducción del crecimiento.

**b.** Valores promedio de las notas\* atribuidas a la carga viral de ToYSV, para cada cultivar, durante la dinámica de muestreo a partir de una concentración predeterminada de 100 ng.µL<sup>-1</sup> de ADN viral.

\* escala descrita por González (2011) donde: 0: muestra de planta sin detección de ADN viral; 1: muestra de planta con una concentración de ADN viral inferior a los 100 ng.µL<sup>-1</sup>; 2: muestra de planta con una concentración de ADN viral igual a los 100 ng.µL<sup>-1</sup>; 3: muestra de planta con una concentración de ADN viral superior a los 100 ng.µL<sup>-1</sup>.

De manera similar, los cultivares ‘TY52’, ‘STY3’, ‘STY6’ y ‘STY7’ también presentaron plantas con concentraciones promedio del virus cercanas y por encima de los  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , durante todas las etapas del muestreo (Fig. 9b) alcanzando la condición de susceptible a partir de los 30 días después de realizada la inoculación, momento en que las plantas mostraron los síntomas típicos de ToYSV, los que se correspondieron con valores promedio superiores a 1, en la escala de severidad (Fig. 9a). Solamente los cultivares ‘TY52’ y ‘STY3’ presentaron infecciones latentes pasados 15 días de realizada la inoculación.

Para la selección de los cultivares resistentes a ToYSV y ToSRV se tuvo como criterio la identificación de aquellos que no presentaron los síntomas típicos de la enfermedad de ambos aislados virales, así como una infección restringida del virus determinada por valores promedio de contenido viral igual o menor a  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (por debajo de 2, según la escala de notas utilizada para este carácter (sección **3.4.1.3**)).

En este sentido, los cultivares ‘Vyta’, ‘L7’, ‘TX468-RG’, ‘STY4’ y ‘STY5’ mostraron un comportamiento resistente. De ellos, ‘Vyta’, ‘L7’ y ‘TX468-RG’ resultaron ser los más, pues no presentaron síntomas de la enfermedad durante todos los momentos del muestreo (15 dpi, 30 dpi y 45 dpi), aunque sí tuvieron multiplicación viral del ADN de ToYSV en sus plantas por debajo de los  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (Fig. 9). Los cultivares ‘STY4’ y ‘STY5’ en cambio, presentaron valores promedio de síntomas en sus plantas por debajo de 1 en la escala (Fig. 9a) y concentraciones promedio del virus por debajo de los  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de ADN, las que fueron invariables para ‘STY5’ hasta los 45 dpi, última evaluación realizada (Fig. 9b).

Nótese como, a los 30 días después de la inoculación se identificó el total de cultivares susceptibles, tres más (‘TY52’, ‘STY6’ y ‘STY7’) que los observados en los primeros 15 días después de inoculadas las plantas (Fig. 9). También para estas fechas, los valores promedio de contenido viral fueron diferentes a los detectados pasados los primeros 15 días de la inoculación (Fig. 9b).

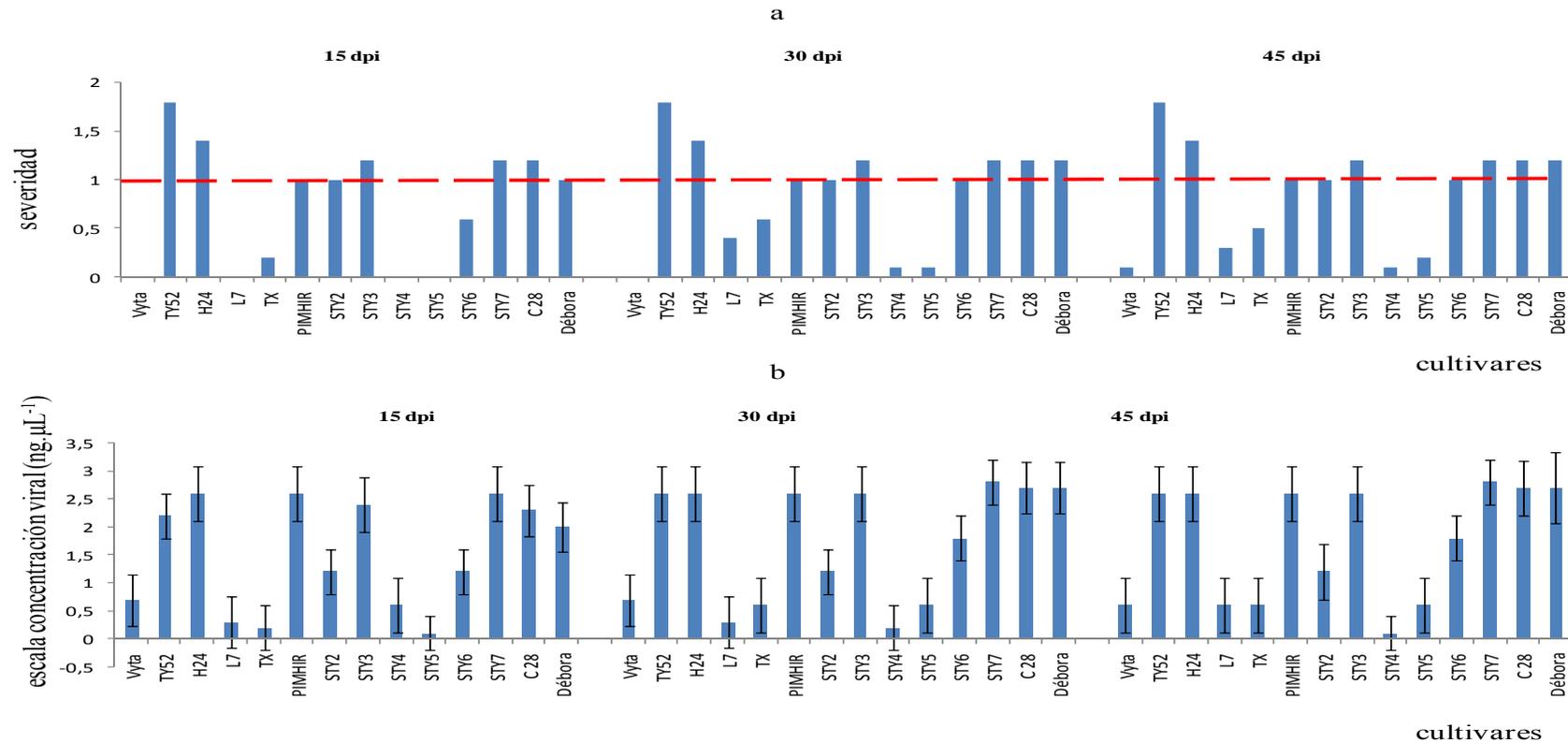
La respuesta de los cultivares frente a ToSRV, el otro aislado brasileño de un begomovirus bipartito se muestra en la figura 10.

Trascurridos solo 15 días de la inoculación, los cultivares ‘TY52’, ‘H24’, ‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘STY3’, ‘STY7’, ‘Campbell 28’ y ‘Débora’, ya tenían síntomas en sus plantas, con severidad igual y superior a 1, los cuales fueron poco variables, a los 30 y 45 días después de realizada la inoculación (Fig. 10a). Por su parte, las plantas de los cultivares ‘TY52’ y ‘H24’ tuvieron un valor promedio en síntomas superior, en todas las evaluaciones, al de los controles susceptibles ‘Campbell 28’ y ‘Débora’. Esta gama de síntomas relacionados con la susceptibilidad de todos estos cultivares se correspondió, con plantas que presentaron concentraciones del virus, en la gran mayoría de ellos, superior a los 100 ng.μL<sup>-1</sup> de ADN (Fig. 10b).

El cultivar ‘STY6’ también presentó plantas con concentraciones virales promedio cercanas y por encima de los 100 ng.μL<sup>-1</sup>, durante todas las etapas del muestreo (Fig. 10b) y alcanzó la condición de susceptible a los 30 días después de realizada la inoculación, cuando las plantas mostraron los síntomas típicos de ToSRV y se correspondieron con valores de 1 en la escala de severidad (Fig. 10a).

En cambio, los cultivares ‘Vyta’, ‘L7’, ‘TX468-RG’, ‘STY4’ y ‘STY5’ mostraron un comportamiento resistente. Entre estos, el cultivar ‘Vyta’ manifestó infecciones latentes hasta los 30 dpi y sus plantas presentaron concentraciones virales por debajo de los 100 ng.μL<sup>-1</sup> de ADN viral, las que presentaron poca variación en todas las evaluaciones (Fig. 10b). Sin embargo, los cultivares ‘L7’, ‘STY4’ y ‘STY5’ que presentaron infecciones latentes a los primeros 15 días después de la inoculación, sus contenidos virales en plantas fueron muy variables (‘L7’ y ‘STY5’ aumentaron su contenido en el tiempo y ‘STY4’ lo disminuyó), manteniendo siempre valores por debajo de los 100 ng.μL<sup>-1</sup>.

Nótese como, a los 30 días después de realizada la inoculación se identificó el total de cultivares susceptibles, uno más (‘STY6’) que los observados en los primeros 15 días después de inoculadas las plantas (Fig. 10). Para estos tres momentos, 15, 30 y 45 días pos inoculación, no se detectaron diferencias entre los valores promedio del contenido viral de ninguno de los cultivares en estudio (Fig. 10b).



**Figura 10. a.** Valores promedio de severidad\* expresados por los cultivares en estudio, ante la inoculación por biobalística, para ToSRV.

\*: escala de severidad descrita por Giordano y *col.* (2005b) adaptada a los síntomas característicos de ToSRV, donde 0: planta sin síntomas; 1: planta con manchas cloróticas y epinastía; 2: planta con mosaico severo, epinastía, distorsión foliar y reducción del crecimiento.

**b.** Valores promedio de las notas\* atribuidas a la carga viral de ToSRV, para cada cultivar, durante la dinámica de muestreo a partir de una concentración predeterminada de 100 ng.µL<sup>-1</sup> de ADN viral.

\*escala descrita por González (2011) donde: 0: muestra de planta sin detección de ADN viral; 1: muestra de planta con una concentración de ADN viral inferior a los 100 ng.µL<sup>-1</sup>; 2: muestra de planta con una concentración de ADN viral igual a los 100 ng.µL<sup>-1</sup>; 3: muestra de planta con una concentración de ADN viral superior a los 100 ng.µL<sup>-1</sup>.

De las dos especies virales utilizadas en el escrutinio, ToYSV resultó ser más agresiva que ToSRV, en cuanto a la expresión de los síntomas que mostraron las plantas de los cultivares susceptibles.

ToYSV fue descrito en la zona metalúrgica del estado de Minas Gerais, en Brasil y es una especie que, además de infectar el cultivo del tomate e inducir síntomas severos, infecta algunas especies de plantas invasoras del género *Macroptilium* y *Sida* (Calegario, 2004). Investigaciones realizadas por Ambrozevicius y col. (2002), enunciaron que ToYSV es uno de los begomovirus más agresivos que afecta el tomate en Brasil, aunque se desconoce de estudios que cuantifiquen los daños que le causa al cultivo.

Atendiendo al criterio empleado en la investigación para discernir entre susceptibilidad y resistencia, se identificaron un total de nueve cultivares susceptibles ('TY52', 'H24', 'PIMHIR', 'STY2', 'STY3', 'STY6', 'STY7', 'Campbell 28' y 'Débora') y cinco cultivares resistentes ('Vyta', 'L7', 'TX468-RG', 'STY4' y 'STY5'), que fueron comunes para ambas especies virales (Fig. 9 y 10).

En este caso, se observó una reducción en el número de cultivares que fueron resistentes para las especies de begomovirus con genoma bipartito, con respecto a los que lo fueron para la especie de genoma monopartito. Una disminución en el número de cultivares también se observó en los resultados informados por grupos de investigación de los Estados Unidos (Scott y Schuster, 1991), Brasil (Santana y col., 2001), Trinidad y Tobago (Rampersad y Umaharan, 2003), La India (Maruthi y col., 2003) e Islas Reunión (Delatte, 2005), cuando comenzaron la búsqueda de fuentes de resistencia a begomovirus bipartitos presentes en estos países, a partir de cultivares previamente descritos como resistentes a TYLCV.

Esta diferencia en la respuesta ante begomovirus con genomas mono y bipartito pudo estar determinada por diferentes eventos que pueden acontecer durante la interacción específica entre la planta y estos patógenos, como son: que las proteínas encargadas del movimiento viral para los monopartitos con respecto a los bipartitos son diferentes (Zúñiga y Ramírez, 2002), lo que constituyen blancos desiguales para la respuesta de resistencia de la planta; que no exista un reconocimiento entre los productos de los genes

de avirulencia de los begomovirus mono y bipartitos con los productos de los genes de resistencia de algunos hospedantes (Jones y Dangl, 2006; Ojito y Portal, 2010), los que pueden ser específicos a una especie viral; a las diferencias que existen entre las secuencias genómicas de los genes que codifican para las diferentes proteínas involucradas en el ciclo de vida entre begomovirus mono y bipartitos y entre aislados de una misma especie viral (Green y Shanmugasundaran, 2007).

En relación con la susceptibilidad, se observó que, los cultivares utilizados como controles susceptibles a la enfermedad ('Campbell 28' y 'Débora') corroboraron este carácter ante las dos especies virales inoculadas, lo que ratificó la decisión acertada de su empleo. El comportamiento del cultivar 'Débora' fue semejante al descrito por González y col. (2011) al realizar un tamizaje en accesiones del Banco de Germoplasma de tomate de la Universidad Federal de Viçosa (UFV), para la búsqueda de fuentes de resistencia a ToYSV.

En el caso del cultivar 'Campbell 28', estudios realizados por Ramos (2004) demostraron su carácter susceptible cuando fue inoculado con el begomovirus cubano de genoma bipartito *Tomato mottle Taino virus* (ToMoTV). Este es un cultivar que ha mostrado susceptibilidad a otras especies de begomovirus que poseen genoma monopartito (Fuentes y col., 2006) y bipartitos (Martínez y col., 1998).

Resultó muy interesante la respuesta de susceptibilidad expresada por los cultivares 'TY52' y 'H24' (Fig. 9 y 10) cuando estos han exhibido altos niveles de resistencia a TYLCV, especie viral del género *Begomovirus* reconocida como la más devastadora para el cultivo del tomate (Czosnek y col., 2007). Sin embargo, un comportamiento susceptible frente a otras especies de begomovirus bipartitos ha sido descrito por diferentes grupos de investigación, lo que nos hace pensar que pueden ser otros los genes involucrados en la resistencia.

Relacionado con ello, Santana y col. (2001) en la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia a un aislado de begomovirus de Brasilia, empleando una inoculación mediada por mosca blanca, determinaron el carácter susceptible de 'TY52' cuando las plantas evaluadas presentaron un 100% de incidencia y contenido viral con un valor en la escala

de severidad de 3,3 para un máximo de 4. En las investigaciones realizadas por Mejía y col. (2005), también se describió la susceptibilidad de ‘TY52’, cuando se empleó como control resistente y posible fuente de resistencia ante las diferentes especies virales que circulaban por los campos de producción en Guatemala.

En el caso del cultivar ‘H24’, Tripathi y Varma (2002) lo clasificaron como un material altamente susceptible al presentar los síntomas típicos de *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), en el 70% de sus plantas, durante la búsqueda de fuentes de resistencia a esta especie viral. Por otro lado, Mejía y col. (2005), evaluando a ‘H24’ frente a las especies de begomovirus presentes en Guatemala, lo descartaron por ser un material altamente susceptible y no fue utilizado como fuente de resistencia en los programas de mejoramiento genético de tomate en este país.

La susceptibilidad de los cultivares ‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘STY3’, ‘STY6’ y ‘STY7’ se expresó con la sintomatología que desarrollaron sus plantas, para ambas especies virales, y el elevado contenido viral. Al parecer, la resistencia de estos cultivares, que proviene de diferentes especies silvestres (Tabla 2), no resultó efectiva frente a ToYSV y ToSRV, a pesar de que se han descrito, por diversos investigadores, nuevas fuentes de resistencia a begomovirus con genomas bipartitos en accesiones que provienen de las especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon* (Santana y col., 2001; Tripathi y Varma, 2002; Matos y col., 2003; Lourenção y col., 2004; Mejía y col., 2005; Bian y col., 2007; Martínez y col., 2008).

Varios trabajos de investigación han descrito el comportamiento resistente de materiales obtenidos a partir de la especie silvestre *S. peruvianum* frente a diferentes aislados de begomovirus mono y bipartitos (Santana y col., 2001; Lapidot y col., 2006). La resistencia de los cultivares ‘STY6’ y ‘STY7’ provino de esta especie y, sin embargo, se comportaron como susceptibles frente a ambas especies virales evaluadas (ToYSV y ToSRV).

Por otro lado, los trabajos desarrollados por Giordano y col. (2005a) y Mejía y col. (2005) seleccionaron a ‘STY6’ por el comportamiento resistente a *Tomato chlorotic*

*mottle virus* (ToCMoV) en Brasil y a begomovirus bipartitos presentes en las regiones de Centro América.

En este sentido, investigaciones desarrolladas por Ji y *col.* (2007b) describieron sobre la respuesta diversificada y no específica que han presentado las diferentes fuentes de resistencia a begomovirus, ante las diferentes especies del género a que fueron sometidas y en los diferentes agroecosistemas donde fueron evaluadas. De manera similar, Van der Plank (1968) se refirió a que existía un equilibrio entre el ambiente, el patógeno y el hospedante donde la afectación en alguno de estos tres elementos puede desencadenar beneficios o afectaciones para el desarrollo de la enfermedad.

El comportamiento resistente de ‘Vyta’ tanto a TYLCV-IL [CU] como a ToYSV y ToSRV pudo estar relacionado con la presencia de otros mecanismos de resistencia, diferentes a los conferidos por el gen *Ty-1*, que fueron incorporados durante su obtención. En la genealogía de este cultivar se utilizó al híbrido ‘Tyking’ (Piñón, 2009), del cual se han obtenido varias líneas, cuya resistencia está dada por los genes *tcm-1* y *tgr-1* (Bian y *col.*, 2007), genes recesivos que confieren resistencia a begomovirus en estado de homocigosis (Giordano y *col.*, 2005a).

Esta hipótesis fue reforzada por el comportamiento de los cultivares ‘TX468-RG’ y ‘STY5’, los que también tuvieron su origen a partir de ‘Tyking’. Estos materiales no presentaron los síntomas característicos de la infección viral y la concentración de virus fue inferior a los 100 ng.µL<sup>-1</sup> de ADN para ambas especies virales (ToYSV y ToSRV) (Fig. 9 y 10).

Los trabajos desarrollados por Santana y *col.* (2001) y Giordano y *col.* (2005a) con ‘TX468-RG’ determinaron su carácter resistente a begomovirus bipartitos que afectaban al cultivo en zonas productoras del estado de Brasilia. Este cultivar también presentó resistencia al aislado cubano (secciones 4.1.1 y 4.1.2) y al aislado israelita de TYLCV (García y *col.*, 2008; Pereira, 2009), lo que evidenció la resistencia amplia a begomovirus de ambos genomas que presenta ‘TX468-RG’.

También, investigaciones realizadas con 96 accesiones del Banco de Germoplasma de Hortalizas (BGH), de la Universidad Federal de Viçosa indicaron la resistencia a

ToYSV en la accesión BGH 224 de *S. lycopersicum*, la cual podría estar mediada por un gen recesivo (González, 2007).

Un análisis general de los resultados obtenidos a partir del tamizaje de todos los cultivares, frente a las tres especies virales demostró que, las inoculaciones artificiales en el estadio fenológico de dos hojas verdaderas resultó ser un momento confiable para la selección de los cultivares resistentes. Este resultado coincidió con los estudios realizados por Levy y Lapidot (2008) en la determinación de la edad fisiológica óptima de las plantas para la inoculación. Estos, propusieron realizar las inoculaciones en este estadio del desarrollo vegetativo de las plantas para la clasificación de materiales resistentes, pues mientras más temprana se realizaba la inoculación los efectos de la infección viral son más severos y el tamizaje resulta más confiable para la selección.

Por otro lado, se observó como a los 30 dpi se determinó el número de cultivares susceptibles y resistentes, a pesar de los tres métodos de inoculación artificial empleados. Tal condición se mantuvo hasta la última etapa de evaluación (45 dpi) (Fig. 3, 4, 5, 9 y 10) (Tabla 5). Este podría ser el momento oportuno para realizar el tamizaje, lo cual permitiría un ahorro en tiempo y recursos en comparación con las evaluaciones realizadas por algunos autores (Vidavsky y Czosnek, 1998; Pietersen y Smith, 2002), casi al final del ciclo de vida de las plantas (45-65 dpi), cuando ya ha pasado el período crítico del cultivo frente al patógeno (Morales y *col.*, 2006).

A su vez, la hibridación de ácidos nucleicos (radiactiva y no radiactiva) permitió detectar el contenido viral de las tres especies virales en las plantas de los cultivares evaluados, lo cual apoyó también en la caracterización de la resistencia de estos. Esta técnica ha sido una herramienta utilizada en diversos programas de mejora genética del tomate, a nivel internacional, permitiendo el diagnóstico y estimación de las concentraciones virales de los materiales evaluados para la determinación y selección de cultivares resistentes (Picó y *col.*, 2001; Lapidot y *col.*, 2006; Barbieri y *col.* 2011).

En Cuba, resultados con aplicaciones de este método en el diagnóstico y control de begomovirus ha constituido una herramienta que ofrece ventajas en el procesamiento masivo de muestras vegetales, con bajos riesgos de contaminación durante el análisis y

una elevada especificidad (Martínez y *col.*, 2003; Gómez y *col.*, 2004; Quiñones y *col.*, 2004; Fuentes y *col.*, 2006).

No es menos cierto el papel que desempeñaron las inoculaciones realizadas con el uso de la biobalística para el escrutinio y selección de materiales resistentes. Sin embargo, esto no es lo que ocurre de forma natural de modo que, algunos mejoradores se abstienen a utilizar herramientas que puedan estar enmascarando algunos mecanismos que se activan durante las interacciones que se establecen entre el vector y el hospedante, venciendo ciertas barreras (Pico y *col.*, 2001; Byoung y *col.*, 2005; Palukaitis y Carr, 2008; Gómez y *col.*, 2009).

A pesar de lo anterior, existen grupos de investigación que ponen en práctica el uso de todos los posibles métodos de inoculación viral, o combinaciones de ellos, para la selección acertada de materiales resistentes durante las etapas del pre mejoramiento (Tripathi y Varma, 2002; Bian y *col.*, 2007; Lapidot y *col.*, 2007; Levy y Lapidot, 2008).

Todos estos elementos condujeron a que fuese necesario conocer el comportamiento de las fuentes de resistencia en estudio, en condiciones de campo frente a estos fitopatógenos y determinar si mantenían sus condiciones de resistencia o susceptibilidad.

#### ***4.3.2 Evaluación de cultivares frente a begomovirus bipartitos, en condiciones de infección natural.***

Los resultados de la parcela experimental (Tabla 7), mostraron una serie de comportamientos que se describen a continuación.

Por una parte, prevaleció la sintomatología de mosaico ligero en la gran mayoría de los cultivares y solamente en ‘Débora’ fue diferente, presentando un mosaico severo en sus hojas (Tabla 7).

Los materiales que resultaron susceptibles en los experimentos realizados por biobalística (‘TY52’, ‘H24’, ‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘STY3’, ‘STY6’, ‘STY7’, ‘Campbell 28’ y ‘STY1’) frente a las dos especies virales, también presentaron este comportamiento en el campo, al mostrar la mayor diversidad de síntomas y el mayor número de plantas expresándolos (Tabla 7).

Los cultivares que fueron seleccionados como resistentes en los experimentos empleando la técnica de biobalística ('Vyta', 'L7', 'TX468-RG', 'STY4', 'STY5'), frente a ToYSV y ToSRV, mantuvieron igual condición en campo. Dichos materiales, generalmente, presentaron infecciones latentes, determinadas por hibridación de ácidos nucleicos, y solo síntomas ligeros de amarilleamiento en un número reducido de plantas (máximo dos). 'STY5' no presentó plantas con síntomas (Tabla 7).

Estas infecciones latentes, pudieron estar condicionadas porque en el área experimental no se realizaron aplicaciones de insecticida para controlar las poblaciones de mosca blanca infectadas con virus. La toma de muestras se realizó bajo estas condiciones y pudiera ser probable que lo que se detectó de carga viral en algunas de las plantas de los materiales resistentes no sean formas replicativas del virus, sino nuevas partículas virales depositadas durante la alimentación por el insecto vector.

Los controles susceptibles 'Campbell 28' y 'Débora' mantuvieron su condición de susceptibilidad, presentando todas sus plantas una amplia diversidad de síntomas en el área experimental (Tabla 7).

Los cultivares 'L7' y 'TX468-RG', a pesar de que presentaron plantas donde se detectaron infecciones mixtas de ToSRV con ToYSV (Tabla 7), soportaron la coexistencia de ambas especies virales sin la expresión de síntomas severos. Generalmente, cuando ocurren este tipo de infecciones, los síntomas se acentúan y las consecuencias se tornan más devastadoras (Inoue y *col.*, 2006; Navas y *col.*, 2011).

El análisis de las hibridaciones mostró la prevalencia de ToSRV en el área experimental y de infecciones mixtas con ToYSV. Se divisaron muestras donde coexistieron las tres especies virales (muestras de plantas de 'PIMHIR', 'STY3' y 'Campbell 28') y otras donde solo se detectó ToYSV (muestras en plantas de 'Vyta'). No se amplificaron muestras con presencia única de *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) (Tabla 7).

La prevalencia de ToSRV coincidió con lo enunciado por Fernandes y *col.* (2008). Esta es una especie que se ha encontrado en las regiones productoras de tomate en Brasil, así como en cultivares comerciales de *Capsicum annuum* L. en los estados de Minas Gerais y São Paulo (Gonçales y *col.*, 2010; Nakada y *col.*, 2006, 2010; Rocha y *col.*, 2012).

ToSRV ha estado infectando, por más de 15 años, a cultivos solanáceos en este país (Barbosa y *col.*, 2011).

**Tabla 7.** Evaluación de los síntomas y determinación de las especies virales presentes en las plantas, de cada cultivar, a los 60 días después del trasplante.

Cultivares	No. de plantas positivas/total de plantas							No. de plantas con síntomas/ total	Síntomas <sup>1</sup>
	ToYSV	ToSRV	SiMMV	ToYSV +	ToYSV +	ToSRV +	ToYSV +		
				ToSRV	SiMMV	SiMMV	ToSRV +		
‘Vyta’	4/6	-	-	-	-	-	-	2/10	<i>ml</i>
‘TY52’	-	4/6	-	2/6	-	-	-	7/10	<i>ml, df</i>
‘H24’	-	2/6	-	4/6	-	-	-	10/10	<i>ml, a</i>
‘L7’	-	1/6	-	1/6	-	-	-	2/10	<i>ml</i>
‘TX468-RG’	-	3/6	-	2/6	-	-	-	2/10	<i>ml, a</i>
‘PIMHIR’	-	-	-	4/6	-	-	2/6	10/10	<i>ml, a, df</i>
‘STY2’	-	4/6	-	-	-	-	-	10/10	<i>ml, df</i>
‘STY3’	-	2/6	-	2/6	-	-	2/6	6/10	<i>ml, fr</i>
‘STY4’	-	4/6	-	-	-	-	-	2/10	<i>ml</i>
‘STY5’	-	3/6	-	-	-	-	-	0/10	<i>ss</i>
‘STY6’	-	4/6	-	1/6	-	-	-	4/10	<i>ml, fr, rcp</i>
‘STY7’	-	3/6	-	3/6	-	-	-	9/10	<i>ml, ef, rcp</i>
‘Campbell 28’	-	5/6	-	-	-	-	1/6	10/10	<i>ml, af, ef, rcp</i>
‘Débora’	-	1/6	-	5/6	-	-	-	10/10	<i>ms, a, fr, e, df</i>

<sup>1</sup>: mosaicos ligeros (*ml*); amarilleamientos (*a*); foliolos rugosos (*fr*); deformación de los foliolos (*df*); ampollado en los foliolos (*af*); epinastías (*e*); reducción del crecimiento de la planta (*rcp*); encrespamiento de los foliolos (*ef*).

Las razones por las que prevalece este virus son desconocidas, pero es muy posible que esté relacionado con la transmisión eficiente del biotipo B de *Bemisia tabaci* y a la presencia de reservorios alternativos del virus en los campos donde se desarrolló el cultivo (Nakada y *col.*, 2006).

Infecciones mixtas de ToSRV con otras especies de begomovirus ya fueron descritas. Los trabajos desarrollados por Gonçalves y *col.* (2010) detectaron plantas infectadas con ToSRV y *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) en regiones productoras de tomate y pimiento (*Capsicum annuum*), de São Paulo, Brasil.

Estudios realizados por Calegario y *col.* (2006) y por Castillo y *col.* (2008) evidenciaron la presencia de SiMMV infectando de forma natural a tomate, lo que se observó en los resultados del diagnóstico molecular.

Investigaciones desarrolladas por Calegario y *col.* (2007), durante la caracterización de ToYSV, determinaron las relaciones filogenéticas de este con las especies de begomovirus presentes en *Sida* spp. Esto puso en evidencia el papel que jugaron las especies de begomovirus indígenas, cuando fueron transferidas de las arvenses hasta tomate con la introducción del nuevo biotipo B de mosca blanca, así como el papel que jugaron las recombinaciones en la emergencia y evolución de nuevas especies virales para las regiones de América y el Caribe (Ribeiro y *col.*, 2007, Navas y *col.*, 2011), aspectos importantes a tener en cuenta por fitopatólogos y fitomejoradores.

En la región de Caribe, Roye y *col.* (1999) prospectaron en Jamaica infecciones mixtas entre *Tomato dwarf leaf curl virus* (ToDLCV) y TYLCV en campos de tomate y pimiento. En Cuba, las investigaciones desarrolladas por Martínez y *col.* (2003) informaron la presencia de infecciones mixtas, en tomate, entre TYLCV-IL [CU] y *Tomato mosaic Havana virus* (ToMHV), durante prospecciones realizadas en todas las regiones productoras del país.

Sin dudas, se debe prestar una mayor atención al papel que juegan las infecciones mixtas en la evolución de los begomovirus (Padidam y *col.*, 1999; Navas y *col.*, 2011). Hasta la fecha, no se ha descrito la recombinación natural entre especies que presentan genomas monopartito y bipartito, aunque en teoría es un evento que puede suceder, pues la frecuencia con que ocurren es impulsada por tres factores fundamentales: las infecciones mixtas, los niveles altos de replicación y la gama amplia de hospedantes del vector.

En este sentido, los trabajos desarrollados por Quiñones (2002) demostraron, de forma experimental, la probabilidad de recombinación entre los aislados cubano e israelita de TYLCV y *Tomato mosaic Havana virus* (ToMHV) en los nucleótidos 165-197 de la región común. Por otro lado, investigaciones desarrolladas por Martínez (2008) detectaron varios sitios de recombinación ubicados en la región intergénica (IR) y la región N-terminal de la proteína asociada a la replicación (Rep), para las diferentes

especies de begomovirus descritas en Cuba, los que fueron detectados en arvenses de diferentes familias botánicas y afectando cultivos de importancia alimenticia y económica.

Sin dudas, ambos métodos de inoculación (biobalística e infección natural) permitieron la caracterización de los cultivares, a pesar de las ventajas y limitantes que ofrece cada uno. También, el criterio de evaluar la resistencia de los cultivares teniendo en cuenta la selección simultánea, por los valores de severidad y contenido viral, fue importante para la clasificación de la resistencia.

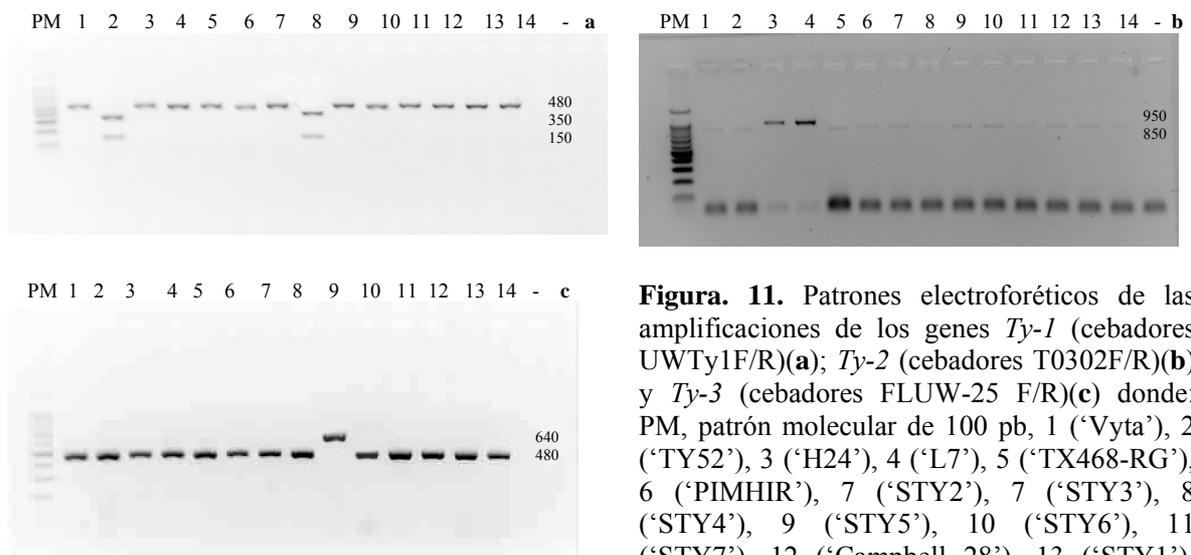
Como se ha referido con anterioridad, la resistencia a begomovirus de los cultivares en estudio es debida a una serie de genes, los cuales se encuentran localizados en diferentes cromosomas del genoma de tomate (Bai y Lindhout, 2007; Foolad, 2007; Sol Genomics Network, 2010). En este sentido, la identificación de los genes de resistencia podría explicar, en cierta medida, el comportamiento expresado por los cultivares ante las diferentes especies virales testadas.

#### **4.4 Determinación de la presencia de los genes de resistencia a begomovirus *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3* en cultivares de tomate.**

El patrón de bandas susceptibles de ‘Campbell 28’ y ‘STY1’ (para todos los genes amplificados) (Fig. 11), coincidió con la susceptibilidad que presentaron estos cultivares a los tres begomovirus y su empleo acertado como controles susceptibles en los programas de mejoramiento para la enfermedad (Gómez y *col.*, 2004; Fuentes y *col.*, 2006; Lapidot y *col.*, 2006).

Para el gen *Ty-1*, las amplificaciones del ADN mostraron que solamente los cultivares ‘TY52’ y ‘STY3’ exhibieron el patrón de bandas resistentes del gen (350 pb y 150 pb), mientras el resto de los materiales presentaron el patrón de banda susceptible (480 pb) (Fig. 11a). Este gen está asociado con la inhibición de los síntomas de la enfermedad e interfiere en las funciones de la proteína responsable con la circulación del virus en la planta (movimiento célula-célula), siendo más eficiente en bajas concentraciones de inóculo (Zamir y *col.*, 1994).

El cultivar ‘STY3’ alcanzó el estado de homocigosis del gen *Ty-1*, (Fig. 11a) a partir de cinco generaciones de autofecundación del híbrido ‘Fiona’ (portador del gen en estado heterocigótico (Piñón, 2009)), sometidas a selección frente al TYLCV-IL, en experimentos desarrollados por el grupo de mejoramiento genético de tomate en el *Volcani Center*, de Israel (Lapidot y col., 2006).



**Figura. 11.** Patrones electroforéticos de las amplificaciones de los genes *Ty-1* (cebadores UWTy1F/R)(a); *Ty-2* (cebadores T0302F/R)(b) y *Ty-3* (cebadores FLUW-25 F/R)(c) donde: PM, patrón molecular de 100 pb, 1 (‘Vyta’), 2 (‘TY52’), 3 (‘H24’), 4 (‘L7’), 5 (‘TX468-RG’), 6 (‘PIMHIR’), 7 (‘STY2’), 7 (‘STY3’), 8 (‘STY4’), 9 (‘STY5’), 10 (‘STY6’), 11 (‘STY7’), 12 (‘Campbell 28’), 13 (‘STY1’), (control del H<sub>2</sub>O).

Resultó interesante que el cultivar ‘Vyta’ no revelara la presencia del gen con el marcador utilizado (TG97). Los trabajos realizados por Piñón y col. (2005) mostraron la presencia del mismo con un marcador de tipo RFLP, a partir de la sonda TG97, presente en la línea LD5 que le dio origen a ‘Vyta’. Esto pudo estar dado porque el marcador empleado no amplificó toda la región de *Ty-1* introgresada en ‘Vyta’ o, al menos, la región que se introgresó del gen y que sí fue detectada por la sonda utilizada por Piñón y col. (2005), que tiene un tamaño de 1 100 pb (Sol Genomics Network, 2010), superior al tamaño de los cebadores del marcador TG97 de tipo CAPS, utilizado en este estudio. En una segunda amplificación con otro marcador ligado al gen, REX-1, tipo CAPS (datos no mostrados) se observó que, el cultivar ‘Vyta’ presentó el fenotipo susceptible, no así para los cultivares ‘TY52’ y ‘STY3’, quienes exhibieron el patrón de bandas relacionadas con la resistencia.

Este resultado pone de manifiesto la necesidad de profundizar en la búsqueda de los diferentes genes que deben estar involucrados con el comportamiento resistente de ‘Vyta’, además de emplear otros marcadores en la identificación del gen *Ty-1*. El cromosoma 6 de tomate es un “punto caliente” en el genoma de la especie, por el número elevado de genes involucrados con la resistencia a los diferentes fitopatógenos que lo afectan (Foolad, 2007; Foolad y Panthee, 2012). En este sentido, el grupo de ligamiento donde se encuentra *Ty-1*, tiene ubicado varios marcadores para su identificación (Ji y col., 2007b). Trabajos relacionados con la búsqueda de otros marcadores localizados en el mismo grupo de ligamiento fueron desarrollados por grupos de investigación en Brasil, con híbridos comerciales y líneas isogénicas de tomate que presentaron este gen de resistencia, a partir del marcador microsatélite SSR 47 (Nizio y col., 2008; Nogueira y col., 2011).

Las investigaciones desarrolladas por González y col. (2007), relacionadas con el análisis de ligamiento entre el gen *Ty-1* y cuatro marcadores codominantes tipo SCAR, permitieron la selección del marcador SCARTY1-3, por la distancia tan corta que se presentó entre el marcador y el gen (0,9 cM), así como por la no necesidad de emplear enzimas de corte para la digestión una vez realizada la amplificación, lo cual reduce los costos de la selección asistida. Otros marcadores para *Ty-1*, del tipo CAPS, fueron identificados por Pérez y col. (2007b) porque se encontraban estrechamente ligados al locus *Ty-1*, siendo seleccionados tres (Aps-1, REX-1, JB-1), de seis probados, por ser los más cercanos al gen.

Por otro lado, Piñón (2009) describió el pedigree del cultivar ‘Vyta’. En su genealogía se realizaron varios retrocruces con el híbrido ‘Tyking’, que porta el gen de resistencia *tcml-1* (Giordano y col., 2005a), por lo que ‘Vyta’ podría tener este gen y así explicaría la resistencia que mostró ante los aislados de las especies virales testadas en Brasil, resultados mostrados en la sección **4.3.1**.

Las amplificaciones del ADN con el marcador de tipo SCAR (T0302) para el gen *Ty-2*, mostraron que solamente los cultivares ‘H24’ y ‘L7’ exhibieron el fenotipo resistente, mientras el resto de los materiales presentaron el fenotipo susceptible (Fig. 11b). La banda que se relacionó con el patrón resistente presentó un tamaño de 950 pb y la del

patrón susceptible un tamaño de 850 pb, aproximadamente. Este resultado coincidió con los obtenidos por García y col. (2007) cuando compararon los resultados que mostraron las amplificaciones de este marcador tipo SCAR (T0302) con los de tipo CAPS (TG105A), siendo el primero más eficiente en la identificación de los genotipos homocigóticos dominantes y en la no selección de falsos positivos, útil para la selección de cultivares y especies silvestres que presentaban el gen.

Se ha planteado que el gen *Ty-2* confiere tolerancia a algunos linajes de TYLCV presentes en el mundo, como son los de Taiwán, norte de Vietnam, sur de la India e Israel, no así para los linajes del norte de la India, Tailandia, Filipinas, América Central y parte de Europa (Mejía y col., 2005; AVRDC, 2006; Barbieri y col., 2010).

Los trabajos desarrollados por Ji y col. (2009b) demostraron la herencia dominante del gen *Ty-2* para TYLCV, cuando evaluaron la resistencia en poblaciones segregantes obtenidas del cruce de ‘H24’ con cultivares susceptibles de los Estados Unidos. La presencia de *Ty-2* en el cultivar ‘L7’ se debe a que uno de sus parentales fue la línea ‘CLN2498C’, a la que se le incorporó este gen a partir de ‘H24’. La mayoría de los programas de mejoramiento en tomate a begomovirus del AVRDC de Taiwán han utilizado este gen como fuente de resistencia a incorporar en genotipos élites que resultaban susceptibles, por su efectividad frente al aislado de TYLCV de este país (Hanson y col., 2006).

Para el gen *Ty-3*, las amplificaciones del ADN con el marcador de tipo SCAR (FLUW-25) mostraron que solamente el cultivar ‘STY4’ exhibió el patrón resistente, mientras el resto de los cultivares presentó el patrón susceptible (Fig. 11c). La banda que se relacionó con el patrón resistente presentó un tamaño de 640 pb y la del patrón susceptible un tamaño de 480 pb, aproximadamente. Resultado que coincidió con los obtenidos por Salus y Maxwell (2006), en la comprobación de la presencia de este locus en líneas e híbridos de tomate, obtenidos por el programa de mejoramiento a begomovirus en Guatemala.

El locus de resistencia a begomovirus *Ty-3*, fue localizado sobre el brazo largo del cromosoma 6. El mismo fue introgresado en líneas avanzadas de tomate, provenientes de un cruzamiento con *S. chilense*, accesiones LA2779 y LA1932, en la Florida, EE.UU.

(Ji y Scott, 2006; Ji y *col.*, 2007a). Los autores, mediante el estudio de una progenie  $F_2$ , identificaron un segmento largo (27 cM), introgresado de LA2779, y uno más corto (6 cM), introgresado de LA1932. Se pudo evidenciar, también, que el locus *Ty-3* explicaba el 65% de la varianza para la resistencia al TYLCV, y el 30% para la resistencia a *Tomato mottle virus* (ToMoV). Estos resultados mostraron un espectro amplio en la resistencia que confiere el gen *Ty-3* ante especies diferentes de begomovirus (Ji y *col.*, 2009a). Todos estos argumentos, podrían explicar el carácter resistente que presentó el cultivar ‘STY4’ frente a las especies virales con genomas mono y bipartitos, en este estudio (secciones 4.1.1, 4.1.2 y 4.3.1). El espectro amplio de resistencia de ‘STY4’, conferido por un gen que no había sido explotado en el país, lo convierte en un material importante para incorporar a los programas de mejora.

Los cultivares ‘TX468-RG’, ‘PIMHIR’, ‘STY2’, ‘STY5’, ‘STY6’ y ‘STY7’ presentaron el patrón del fenotipo susceptible para los tres genes amplificados (Fig. 11), por lo cual su resistencia se corresponde con la de otros genes involucrados con esta respuesta.

Relacionado con ‘TX468-RG’ Giordano y *col.* (2005a) hallaron que este cultivar presentaba el gen *tcm-1* que le confiere resistencia a *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV). Hasta esa fecha, se desconocía la ubicación exacta de *tcm-1* en el genoma de tomate, así como de posibles marcadores de ADN para su identificación. Años más tarde, investigaciones desarrolladas por Pereira (2009), identificaron siete marcadores polimórficos tipo RAPD, los cuales estuvieron muy asociados con la región genómica que contiene a este gen. La ventaja de estos marcadores es que pueden ser empleados en la síntesis de cebadores para convertirlos en marcadores de tipo SCAR que son más estables y pueden, potencialmente, ser llevados a marcadores codominantes para ser aprovechados en la selección asistida, por los programas de fitomejoramiento de la especie.

Los resultados expuestos en este trabajo también evidencian la resistencia de *tcm-1* no solo ante el aislado cubano de TYLCV, sino ante las otras dos especies de begomovirus bipartitos evaluadas (ToYSV y ToSRV). Otras investigaciones desarrolladas en España destacaron que, una línea portadora del gen *tcm-1* mostró un buen comportamiento ante

el TYLCV-IL (García, 2008; García y *col.*, 2008), demostrando el amplio espectro de resistencia del mismo.

El cultivar ‘STY5’ podría presentar el gen anterior o el locus *tgr-1* de resistencia a begomovirus por su propio origen a partir del híbrido comercial ‘Tyking’ (Lapidot y *col.*, 2006). Sin embargo, Hutton y *col.* (2011) en la Florida, Estados Unidos, encontraron en poblaciones segregantes, obtenidas a partir del híbrido, el gen *Ty-5* de resistencia a TYLCV que fue detectado por Ambinder y *col.* (2009) en el cultivar ‘STY7’. Ya en el 2012, Hutton y *col.* (2012) dilucidaron la presencia de un alelo recesivo al que propusieron denominar *ty-5* que cosegregaba con el marcador *SINAC1*, del gen *Ty-5*, y que fue responsable del comportamiento resistente a TYLCV. La posible presencia de estos genes puede estar relacionada con el comportamiento resistente ante las especies de begomovirus con diferentes genomas empleadas en el estudio.

Con relación a ‘PIMHIR’, este es un cultivar cuya fuente de resistencia proviene de *S. pimpinellifolium*. El programa de mejoramiento para TYLCV comenzó en Israel a partir de la accesión LA 121 de esta especie, el cual fue interrumpido pues se encontraron síntomas y pérdidas en el rendimiento en varios de los materiales obtenidos, por lo que la búsqueda fue reorientada hacia otras especies del género (Czosnek y *col.*, 2007).

Sin embargo, algunos programas de los grupos de trabajo de Francia y España han mantenido una búsqueda constante de nuevas fuentes de resistencia en esta especie, pero a otros aislados de TYLCV que son menos agresivos que el de Israel (Pérez y *col.*, 2007a) y que contemplan mecanismos de evasión al insecto vector (Alba, 2006).

En este sentido, los estudios realizados por Chagué y *col.* (1997), identificaron cuatro marcadores tipo RAPD relacionados con un QTL involucrado en la resistencia a TYLCV, en poblaciones segregantes a partir del análisis molecular de las cruces entre el cultivar ‘Rty Azur’ cuya fuente de resistencia proviene de *S. pimpinellifolium* y cultivares susceptibles.

Pérez y col. (2007a), estudiaron la genética de la resistencia de la entrada de *S. pimpinellifolium*, UPV 16991, previamente descrita como resistente a TYLCD por Picó y col. (2000) y determinaron que fue monogénica y con dominancia incompleta.

Para el cultivar ‘STY6’ la resistencia de ha estado mediada por la acción combinada de varios genes de introgresados a partir de *S. peruvianum* (Lapidot y col., 2006). Este es un material que presentó un buen comportamiento ante las especies de begomovirus bipartitos presentes en Guatemala y que ha sido aprovechado por los programas de fitomejoramiento de este país (Mejía y col., 2005).

En trabajos desarrollados por Anbinder y col. (2009) se explica el fenotipo susceptible, mostrado por ‘STY7’, para los tres genes identificados. Según estos autores la resistencia a TYLCV-IL en ‘STY7’, estuvo mediada por un QTL mayor localizado en el cromosoma 4 de la especie, al que denominaron *Ty-5*. A su vez, la acción de este QTL es modificada por otros QTLs menores situados en los cromosomas 1, 7 y 11.

El cultivar ‘STY2’ proviene de otra fuente de resistencia de la que se desconocen los mecanismos involucrados en la respuesta resistente (Lapidot y col., 1997). Este material ha sido utilizado por los programas de mejoramiento en el *Volcani Center* de Israel, desde la validación de sus líneas resistentes a TYLCV-IL, hasta la confección de una escala internacional de severidad para la evaluación de los síntomas causados por este begomovirus (Lapidot y col., 2006).

La existencia en la colección de trabajo del INCA de cultivares que portan los genes de resistencia *Ty-2* y *Ty-3* constituyen los primeros informes para el país. Contar con genotipos portadores de otros genes diferentes a *Ty-1*, en Cuba, permitirá trazar nuevas estrategias de mejoramiento para el programa de mejora de la hortaliza. La obtención de híbridos, líneas o cultivares comerciales, permitirá implementar o consolidar un manejo integrado de plagas, donde la presencia de materiales resistentes constituye una de las premisas necesarias para el desarrollo de una agricultura más “amigable” con el agroecosistema (Navas y col., 2011).

#### **4.5 Discusión general.**

Niks y Lindhout (2004) plantearon que, una resistencia amplia tiene la ventaja de ser efectiva frente a varias especies de fitopatógenos, por lo tanto, la mejora para incrementar el nivel de esta resistencia puede ser bastante eficiente en su efecto.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran como los cultivares ‘Vyta’, ‘L7’, ‘TX468-RG’, ‘STY4’ y ‘STY5’ desarrollaron resistencia para los tres tipos de especies virales evaluadas (Tabla 8). La que se debería aprovechar a partir del uso de estos, como parentales, en los programas de mejora genética para la enfermedad a favor del aprovechamiento del espectro amplio de la resistencia desarrollada por ellos.

Por otro lado, la identificación de cultivares resistentes en la que estén involucrados genes diferentes a *Ty-1* (‘H24’, ‘L7’, ‘TX468-RG’ y ‘STY4’) (Tabla 8), permitirá trazar estrategias para su introducción en cultivares élite susceptibles a begomovirus, lo que condicionará impactos epidemiológicos positivos en el manejo de las especies virales presentes en Cuba, limitando así las dispersiones de estas en condiciones de campo.

Tal como se ha visto, los cultivares ‘TY52’, ‘H24’, ‘L7’, ‘STY3’ y ‘STY4’ mostraron resistencia frente a los patógenos y, además, se les identificó la presencia de genes de resistencia, mediante un marcador ligado, ya sea TG97, REX-1, T0302 o FLUW-25. El empleo de estos cultivares como progenitores en los programas de mejora para resistencia a begomovirus representa un avance considerable con respecto a la selección fenotípica, ya que se podría implementar la selección para la resistencia asistida por marcadores de ADN, a partir de la técnica de RCP, en lugar de inoculaciones sostenidas con el patógeno. También, hace posible explotar las ventajas en la piramidación de genes para garantizar una resistencia más duradera (Ji y *col.*, 2009a).

Todo lo contrario sucedería con los cultivares resistentes ‘Vyta’, ‘TX468-RG’ y ‘STY5’, ya que la selección tendría que ser por la ausencia de síntomas y tasas bajas de replicación viral pues, hasta la fecha, no existen marcadores de los genes involucrados con la resistencia de estos cultivares, para poder efectuar una selección indirecta. De todos estos cultivares, solamente ‘STY4’ fue resistente a las tres especies virales evaluadas y presenta un marcador para el gen involucrado con el carácter, aunque se

desconoce si solo este gen (*Ty-3*) fue el que determinó la resistencia a las tres especies, ya que podrían estar involucrados otros genes de resistencia.

**Tabla 8.** Resumen de la respuesta de resistencia de los cultivares ante las tres especies virales de begomovirus evaluadas y la presencia de marcadores ligados a tres genes de resistencia.

Cultivares	Especies virales evaluadas			Genes de resistencia		
	TYLCV-IL [CU]	ToYSV	ToSRV	<i>Ty-1</i>	<i>Ty-2</i>	<i>Ty-3</i>
‘Vyta’	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	-	-	-
‘TY52’	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	+	-	-
‘H24’	<i>I</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	-	+	-
‘L7’	<i>I</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	-	+	-
‘TX468-RG’	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	-	-	-
‘PIMHIR’	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	-	-	-
‘STY2’	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	-	-	-
‘STY3’	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	+	-	-
‘STY4’	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	-	-	+
‘STY5’	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	-	-	-
‘STY6’ <sup>1</sup>	<i>R/S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	-	-	-
‘STY7’* <sup>1</sup>	<i>R/S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	-	-	-
‘Campbell 28’	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	-	-	-
‘STY1’	<i>S</i>	-	-	-	-	-
‘Débora’	-	<i>S</i>	<i>S</i>	-	-	-

\*: Cultivar con un comportamiento susceptible a TYLCV-IL [CU], inoculado con el insecto vector *Bemisia tabaci* para el período de siembra primavera-verano y resistente para el período de siembra óptimo.

<sup>1</sup> Cultivar susceptible en inoculación con *Agrobacterium tumefaciens*.

*I*: inmune; *R*: resistente; *S*: susceptible. (+): presencia; (-): ausencia.

Los cultivares ‘H24’ y ‘L7’, de inmunidad comprobada, ofrecen numerosas ventajas para el mejoramiento genético de la resistencia a TYLCV-IL [CU], tanto para la obtención de híbridos, como de líneas homocigóticas y cultivares comerciales; por expresar una resistencia dominante parcial en la que, el genotipo heterocigótico muestra valores de resistencia altos, muy cercanos al genotipo homocigótico inmune; determinada por un gen mayor (*Ty-2*), que fue identificable por un marcador.

En este sentido, ‘TX468-RG’ también pudiera ser aprovechado como progenitor en el programa de mejoramiento genético a TYLCV-IL [CU] en Cuba, solo que, a diferencia de los anteriores, no se puede emplear en la obtención de híbridos porque la resistencia

está mediada por un gen recesivo (*tcm-1*), además, no se han identificado marcadores a este.

De acuerdo con Niks y Lindhout (2004) la diversificación de una gran variación de genes para resistencia puede llevar a retardar la adaptación del patógeno y, por tanto, una mayor durabilidad de la efectividad de esos genes en el hospedante. La población del patógeno deberá enfrentarse, simultáneamente, con varios genes efectivos para resistencia. Por lo que le resultará sumamente complejo para el patógeno ser capaz de infectar todos los cultivares utilizados en un programa de diversificación.

Se demostró que la resistencia a ToYSV y ToSRV no estuvo determinada por los genes *Ty-1* y *Ty-2*. Los cultivares ‘TY52’ y ‘STY3’, que presentaron el gen *Ty-1*, fueron susceptibles y resistentes, respectivamente, a ambas especies virales. De igual forma, los cultivares ‘H24’ y ‘L7’, que presentaron el gen *Ty-2* (sección 4.4) mostraron susceptibilidad y resistencia, respectivamente. Existen razones para atribuir la respuesta de resistencia de los cultivares ‘STY3’ y ‘L7’ frente a ToYSV y ToSRV a la activación de otros genes, que podrían ser recesivos, como *tcm-1* y *tgr-1*, enunciados por Giordano y col. (2005a); Bian y col. (2007) y González (2007, 2011), en respuesta a otras especies virales del género *Begomovirus* que comparten igual similitud en número de componentes genómicos.

En este sentido, Jiménez y col. (2010) enunciaron que ‘L7’ provino de dos parentales cuya resistencia se introgró a partir de orígenes diferentes. De acuerdo con ellos, ‘L7’ fue producto del cruce entre las líneas (FLA478-6-1-11) y (CLN2498C). La primera de ellas, portadora de la resistencia de la accesión LA 1938 de *S. chilense* (Bian y col., 2007), con un comportamiento resistente frente a los begomovirus *Tomato mottle virus*, *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV) (bipartitos, del Nuevo Mundo) y *Tomato yellow leaf curl virus* (monopartito del Viejo Mundo) (Ji y col., 2007b; Martínez y col., 2008). En tanto, la segunda es portadora del gen *Ty-2* de resistencia a begomovirus, introducido a partir del cultivar ‘H24’. Es probable que en ‘L7’ se hayan combinado ambas resistencias, lo que explicaría su comportamiento resistente a las tres especies virales evaluadas, contrario a lo que sucedió en las evaluaciones de ‘H24’ frente a ToYSV y

ToSRV, lo cual sustenta que el gen *Ty-2* no determinó resistencia a begomovirus de genomas bipartitos como se discutió en la sección **4.3.1**.

Los genes recesivos relacionados con la resistencia de plantas presentan un mecanismo de acción diferente al de los genes R. Estos, aunque han sido poco estudiados, se describe que están relacionados con factores (proteínas) del hospedante que influyen en la síntesis de las proteínas del virus necesarias para completar su ciclo de vida (replicarse y moverse) Byoung y *col.* (2005).

Los trabajos desarrollados por Hull (1989) describieron que la resistencia a virus opera en cuatro niveles: inhibición de la replicación, movimiento célula a célula (movimiento corta distancia), infección sistémica (movimiento larga distancia) y respuestas de defensas que restringen la infección a un número limitado de células. En este caso, la respuesta de inmunidad de los cultivares ‘H24’ y ‘L7’ a TYLCV-IL [CU] actuó a nivel de inhibición de la replicación viral o del movimiento a corta distancia, pues no se detectó ADN del virus en las hojas apicales de sus plantas, luego de 45 días de la inoculación, con el vector natural y por agroinoculación (secciones **4.1.1** y **4.1.2**).

Sin embargo, la resistencia a las tres especies virales mostrada por ‘Vyta’, ‘TX468-RG’, ‘STY4’ y ‘STY5’ podría estar actuando en el movimiento a corta y larga distancia del virus pues los valores promedio de concentración viral detectados (secciones **4.1.1**, **4.1.2** y **4.3.1**) fueron siempre menores que la de los cultivares susceptibles. Según Martínez y *col.* (2008), este es un tipo de resistencia que debe ser manejada con sumo cuidado pues las plantas que la poseen constituyen fuentes de inóculo en el campo. No obstante, estos mismos autores reconocen que las infecciones en campo tienden a ser más suaves, en comparación con las inoculaciones artificiales; generalmente, por lo tardías y falta de sincronización, donde la edad de las plantas puede influir en el escape de la infección.

En el Caribe, el tomate se continúa cultivando en ambientes muy diversos y el número de agentes patogénicos que lo afectan es muy elevado (Morales, 2010); no obstante, más de una docena de enfermedades poseen control por la vía genética cuya eficiencia es variable, ya sea por el nivel de expresión de la resistencia o por su estabilidad (Laterrot, 2002).

Sin embargo, a pesar de todos los avances logrados por más de 35 años a nivel internacional y más de diez a nivel nacional, hasta el presente, la complejidad de la resistencia a begomovirus continúa siendo de los principales desafíos para los mejoradores de plantas (Pérez, 2010; Navas y *col.*, 2011).

La existencia de más de 35 especies de begomovirus con un amplio rango de expresión y prevalencia a nivel internacional, ha estado entre las causas principales de las pérdidas en los campos de producción de tomate. Afortunadamente, la existencia de varios genes relacionados con la resistencia a begomovirus garantizó la apertura de un espectro de protección a muchos de ellos. Según los criterios de Ji y *col.* (2007b) si los genes de resistencia fueran muy específicos a begomovirus particulares, el mejoramiento genético en tomate para la resistencia se tornaría inefectivo en muchas regiones del mundo donde existen múltiples especies.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, dan respuesta y sientan bases para la proyección estratégica actual del Programa Integral de Cultivos Varios del Ministerio de la Agricultura de Cuba, el cual no permite la liberación y generalización de cultivares de tomate sin resistencia a begomovirus. Este programa se basa, según Pérez (2010), en establecer una estrategia de manejo integrado para el control del complejo mosca blanca-geminivirus, donde juega un papel importante la introducción de nuevos cultivares para consumo fresco con resistencia a estos fitopatógenos y otras enfermedades de importancia económica; con énfasis en aquellas de posible emergencia en el país.

## **V. CONCLUSIONES**

## V. CONCLUSIONES

1. Los cultivares ‘H24’ y ‘L7’ son inmunes al aislado cubano de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL [CU]) mientras que, los cultivares ‘Vyta’, ‘TY52’, ‘TX468-RG’, ‘STY3’, ‘STY4’ y ‘STY5’ son resistentes. De las fuentes de resistencia analizadas, solo ‘PIMHIR’ y ‘STY2’ son susceptibles a TYLCV-IL [CU].
2. La expresión de inmunidad a TYLCV-IL [CU], presente en el cultivar ‘H24’, muestra dominancia parcial y se corresponde, solamente, con los genotipos homocigóticos dominantes para el carácter.
3. Los cultivares ‘Vyta’, ‘L7’, ‘TX468-RG’, ‘STY4’ y ‘STY5’, además de ser resistentes a TYLCV-IL [CU], lo son a los begomovirus bipartitos, *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) y *Tomato severe rugose virus* (ToSRV).
4. Los cultivares ‘TY52’ y ‘STY3’ presentan el gen de resistencia *Ty-1*; *Ty-2* está presente en los cultivares ‘H24’ y ‘L7’ y *Ty-3* está en el cultivar ‘STY4’, según marcadores de ADN ligados a cada gen, lo que permitirá trazar estrategias de mejora genética del cultivo mediante selección asistida.
5. Los genes de resistencia a TYLCV, procedentes de las especies silvestres *S. chilense*, *S. peruvianum* y *S. habrochaites*, están relacionados con los altos niveles de resistencia frente a los tres begomovirus evaluados y solo el que procede de *S. habrochaites* está relacionado con la resistencia celular o inmunidad a TYLCV-IL [CU].
6. El momento propicio para la evaluación de la resistencia a los begomovirus evaluados es a los 30 días posteriores a la inoculación, para todos los métodos de inoculación artificial empleados.

## **VI. RECOMENDACIONES**

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Emplear como progenitores para los programas de mejora del cultivo, los cultivares ‘H24’, ‘L7’, ‘Vyta’, ‘TY52’, ‘TX468-RG’, ‘STY3’, ‘STY4’ y ‘STY5’, por su resistencia a TYLCV-IL [CU].
2. Profundizar en los mecanismos genéticos involucrados en la resistencia expresada por los cultivares ‘Vyta’, ‘TX468-RG’, ‘STY5’ y ‘L7’ a begomovirus bipartitos.
3. Introducir la piramidación de diferentes genes de resistencia, como una estrategia para la obtención de cultivares con resistencia amplia a begomovirus.
4. Evaluar la resistencia de los cultivares estudiados frente a los nuevos begomovirus bipartitos en tomate, emergentes en el país.
5. Obtener cultivares resistentes a TYLCV-IL [CU] a partir de las poblaciones segregantes para el gen *Ty-1* y *Ty-2*, por los marcadores de ADN ligados a cada gen y/o sintomatología y contenido viral.
6. Introducir los resultados obtenidos en la tesis en los programas de pre y postgrado relacionados con la temática en el país.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhary, M., Basavaprabhu, L. y Fauquet, C.M. 2007. Molecular biodiversity, taxonomy and nomenclature of tomato yellow leaf curl-like viruses. En: Czosnek H, ed. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 85-118.
- Accotto, G. P. y Noris, E. 2007. Detection methods for TYLCV and TYLCSV. En: Czosnek H, ed. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 241-249.
- Aidawati, N., Hendrastuti, S., Hidayat, P., Suseno, R., y Sujiphati, S. 2007. Response of various tomato genotypes to begomovirus infection and its improved diagnostic. *HAYATI Journal of Biosciences*. 14 (3): 93-97.
- Akad, F., Eybishtz, A., Edelbaum, D., Gorovits, R., Dar-Issa, O., Iraki, N., y Czosnek, H. 2007. Making a friend from a foe expressing a GroEL gene from the whitefly *Bemisia tabaci* in the phloem of tomato plants confers resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Archives of Virology*. 152:1323-1339.
- Akos, G. y Ervin B. 2010. The solution structures of the *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus* coat proteins explored with molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 28: 569-57.
- Alba, J. M. 2006. Herencia de los mecanismos de resistencia a araña roja en tomate. (Tesis de Doctorado). Universidad de Málaga. Facultad de Ciencias, *Departamento de Biología Vegetal*. 242p.
- Álvarez, M., Moya, C., Florido, M. y Plana, D. 2003. Resultados de la mejora genética del tomate y su incidencia en la producción hortícola de Cuba. *Cultivos Tropicales*. 24 (2): 63-70.
- Álvarez, M.; Moya, C.; Domini, M. E.; Sánchez, J. A.; Martínez, B.; Pérez, S. y Cuartero, J. 2004. 'Amalia', a medium fruit-size, heat-tolerant tomato cultivar for tropical conditions. *J. Hort. Science*. 39 (6): 1503-1504.
- Álvarez, M. 2011. La selección asistida por marcadores (MAS Marker-Assisted Selection) en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*. 32(3): 46-58.
- Ambrozevicius, L. P., Calegario, R.F., Fontes, E. P. B., Carvalho, M. G., y Zerbini, F. M. 2002. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatología Brasileira*. 27: 372-377.
- Anbinder, I., Reuveni, M., Azari, R., Paran, I., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Lapidot, M., y Levin, I. 2009. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus*

## Referencias Bibliográficas

- resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 119: 519-53.
- Andrade, E. C., Ambrozevicius, L. P., Calegario, R. F., Fontes, E. P. B., y Zerbini, F. M. 2002. Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research*. 7:153.
- Andrade, G. M., Sartoretto, L. M., y Brasileiro, A. C. M. 2003. Biología molecular del proceso de infección por *Agrobacterium* sp. *Fitopatología Brasileira*. 28: 465-476.
- Andrade, E. C., Manhani, G. G., Alfenas, P. F., Calegario, R. F., Fontes, E. P. B., y Zerbini, F. M. 2006: *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*. 87: 3687-3696.
- Anfoka, G., Haj Ahmad, F., Abhary, M., y Hussein, A. 2009. Detection and molecular characterization of viruses associated with tomato leaf curl disease in cucurbit crops in Jordan. *Plant Pathology*. 58: 754-762.
- Aragão, F. J. L., Barros, L. M. G., Brasileiro, A. C. M., Ribeiro, S. G., Smith, F. D., Sanford, J. C., Faria, J. C., y Rech, E. L. 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*. 93: 142-150.
- Argüello, G. R., Guevara, R. G., Herrera, L. R., y Rivera, R. F. 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology*. 203(1): 90-100.
- Argüello, G. R y Ruiz, 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. *Archives of Virology*. 146(8): 1465-1485.
- AVRDC. Promising tomato lines resist leaf curl viruses. 2006. News AVRDC. Shanhua, Taiwan: AVRDC–The World Vegetable Center. viii, p.196.
- Azizi, A., Mozafari, J., y Shams, M. 2008. Phenotypic and molecular screening of tomato germplasm for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Iranian Journal of Biotechnology*. 6(4): 199-206.
- Bai, Y., y Lindhout, P. 2007. Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future? *Annals of Botany*. 100: 1085-1094.
- Baldin, E. L., Vendramim, J. D., y Lourenção, A. L. 2005. Resistência de Genótipos de Tomateiro à Mosca-Branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology*. 34: 435-441.

## Referencias Bibliográficas

- Barbieri, M., Acciarri, N., Sabatini, E., Sardo, L., Accotto, G. P., y Pecchioni, N. 2010. Introgression of resistance to two Mediterranean virus species causing Tomato yellow leaf curl into a valuable traditional tomato variety. *Journal of Plant Pathology*. 92(2): 485-493.
- Barbosa, J. C., Barreto, S. S., Inoue, A. K., y Rezende, J. A. M. 2011. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of *Tomato severe rugose virus*. *Journal of Phytopathology*. 159: 644-646.
- Bellow, T. S., Perring, T. M., Gell, R. J. y Meadrick, D. M. 1994. Description of a species of *Bemisia* (Homóptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87(2): 195-206.
- Betül, K., y Tanyolaç, B. 2009. Screening of F<sub>3</sub> Segregation Population Lines Revealed by *Ty-1* Markers Linked to Resistance Locus of Tomato Yellow Leaf Curl Disease (TYLCD) in Tomato (*Lycopersicum. esculentum*). *International Journal of Natural and Engineering Sciences*. 33: 149-153.
- Bian, X. Y., Thomas, M. R., Rasheed, M. S., Saeed, M., Hanson, P., De Barro, P. J. y Rezaian, M. A. 2007. A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. *Phytopathology*. 97: 930-937.
- Boevink, P. y Oparka, K. J. 2005. Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiology*. 38: 1815-1821.
- Boiteux, L. S., Inoue, A. K., y Giordano, L. B. 2001. Diversity of geminiviruses affecting tomatoes (*Lycopersicon* spp.) in Brazil and perspectives of genetic control. *Virus Reviews and Research*. 6: 50.
- Boiteux, L. S., Oliveira, V. R., Silva, C. H., Makishima, N., Inoue, A. K., Fonseca, M. E. N., y Giordano, L. B. 2007. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite begomovirus species. *Horticultura Brasileira*. 25: 20-23.
- Borém, A., y Miranda, G.V. 2005. Melhoramento de plantas. Viçosa: UFV 4<sup>a</sup>. ed. 525p.
- Bosco, D., Loria, A., Sartor, C., y Cenis, J. L. 2006. PCR-RFLP Identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean Basin. *Phytoparasitica*. 34: 243-251.
- Brown, J. K. 2007. The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variation and relevance to TYLCV-vector interactions. En: Czosnek H, ed. Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 25-56.
- Byoung, K., Inhwa, Y., y Molly, M. 2005. Genetics of plant virus resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 581-621.

## Referencias Bibliográficas

- Caciagli, P., Bosco, D., y Al-Bitar, L. 2000. Relationships of the Sardinian isolate of Tomato yellow leaf curl geminivirus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*. *Gen. European Journal of Plant Pathology*. 101: 163-170.
- Calegario, R. F. 2004. Caracterização do isolado de begomovírus MG-Bi2, um possível membro da espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV). (Tese M.S.), Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 48p.
- Calegario, R. F., Andrade, E. C., Ferreira, S. S., Manhani, G. G., y Zerbini, F. M. 2006. Biological and molecular characterization of a tomato isolate of *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV). *Fitopatologia Brasileira*. 30: 180.
- Calegario, R. F., De Siqueira, S. F., Chumbinho, E. A., y Zerbini, F. M. 2007. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 42: 1335-1343.
- Cancino, M., Abouzid, A. M., Morales, F. J., Purcifull, D. E., Polston, J. E y Hiebert, E. 1995. Generation and characterization of three monoclonal antibodies useful in detecting and distinguish bean golden mosaic virus isolates. *Phytopathology*. 85: 484-490.
- Candolle, A. 1883. Origine des plants cultivées. Paris: G Baillière. 377pp.
- Caruana, M. 2007. Coordinator report. Final Report BETOCARIB ICA4-2001-10002. Disponible en: <http://betocarib.cirad.fr>.
- Casanova, A., Gómez, O., Pupo, F. R., Hernández, M., Chailloux, M., Depestre, T., Hernández, J. C. [y col.] .2007. Manual para la Producción Protegida de Hortalizas. 2ª Edición. MINAGRI-IIHLD (eds.). ISBN. 959 7111 37 3. 138 pp.
- Castillo, G. P. 2008. Diversidade e estrutura genética de begomovírus em duas regiões produtoras de tomate do Sudeste do Brasil. (Tese D.S). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 107p.
- Castillo, G. P., Beserra, J. E. A., Bruckner, F. P., Lima, A. T. M., Varsani, A., Alfenas, P., y Zerbini, F. M. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology*. 153 : 1985-1989.
- Causse, M., Carranta, C., Saliba, V., Moretti, A., Damidaux, R., y Rouselle, P. 2000. Valorisation des ressources génétiques de la tomate par l'utilisation de marqueurs moléculaires. *Agricultures*. 9(3): 197-210.
- Chagué, V., Mercier, J.C., Guenard, M., de Courcel, A., y Vedel, F. 1997. Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYLCV in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 671-677.

## Referencias Bibliográficas

- Chen, H., Fu, R., y Li, X. 2011. Tomato yellow leaf virus (TYLCV): The structure, ecotypes and the resistance germplasm resources in tomato. *African Journal of Biotechnology*. 10(62): 13361-13367.
- Chiang, B. T., Maxwell, D., y Green, S. 1994. *Leaf curl virus* in Taiwan. *Tomato leaf curl Newsletter*. 5: 3.
- Chomdej, O., Chatchawankanpanich, O., Kositratana, W., y Chunwongse, J. 2007. Response of resistant breeding lines of tomato germplasm and their progenies with Seedathip3 to *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*, Thailand isolate (TYLCTHV-[2]). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 29(6): 1469-1477.
- Chu, C., Freeman, T. P., Buckner, J. S., Henneberry, T. J., Nelson, D. R., y Natwick, E. E. 2001. Susceptibility of upland cotton cultivars to *Bemisia tabaci* Biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) in relation to leaf age and trichome density. *Annals of the Entomological Society of America*. 94: 743-749.
- Cooper, J. I., y Jones, A. T. 1983. Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology*. 73: 127-128.
- Cordero, M., Ramos, P. L., Hernández, L., Fernández, A. I., Echemendía, A. L., Peral, R., González, G., García, D., Valdés, S., Estévez, A., y Hernández, K. 2003. Identification of *Tomato mottle Taino begomovirus* strains in Cuban potato fields. *Phytoparasitica*. 31(5): 478-489.
- Cuellar, M. E. y Morales, F. J. 2006. La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) como plaga y vectora de virus en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Colombiana de Entomología*. 32(1): 1-9.
- Czepak, C., Borges, J. D., Santos, J. B., y Santana, H. G. 2009. Praga dos séculos: mosca-branca em tomate. *Revista Cultivar*. 55: 22-27.
- Czosnek, H., A. Khey, B., Gronenborn, E., Remetz, M., Zeidan, A., Altman, H. D., Rabinowitch, S., Vidavsky, N., Kedar, Y., Gafni, y Zamir, D. 1993. Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) DNA in agroinoculated leaf-disks from selected tomato genotypes. *Plant Molecular Biology*. 22: 995-1005.
- Czosnek, H. 2007. Interactions of Tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector. En: Czosnek H, ed. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 157-170.
- Czosnek, H., Lapidot, M., Polston, J., y Maxwell, D. 2007. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease. Management, molecular biology, breeding for resistance*. Netherlands: Springer. p. 439. ISBN: 978-1-4020-4768-8.

## Referencias Bibliográficas

- Darwin, S. C., Knapp, S., y Peralta, I. E. 2003. Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Systematics and Biodiversity*. 1: 29-54.
- Delatte, H. 2005. Study of the pathosystem: Begomovirus/*Bemisia tabaci*/tomato on the South West islands of the Indian Ocean. Ph.D Thesis. Wageningen University, the Netherlands. 160 p.
- Delatte, H., Naze, F., Cottineau, J. S., Lefeuvre, P., Hostachy, B., Reynaud, B., y Lett, J. M. 2006. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* on tomato in Reunion Island. *Plant Pathology*. 55: 289.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., y Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1: 19-21.
- Díez, M. J., Picó, B., y Nuez, F. 2000. Desarrollo de líneas de tomate resistentes al virus del rizado amarillo de la hoja del tomate. Actas de Horticultura. XII Jornadas de selección y mejora de plantas hortícolas. Huesca del 11-14 de septiembre. 151-158.
- Díez, M., y Nuez, F. 2008. Tomato. En: Prohens, J., Nuez, F., y Carena, M. J., ed. Handbook of plant breeding Vegetables II Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae and Umbelliferae. New York. Springer. 249-323p.
- Djian, C., Lefebvre, V., Sage, A. M., y Pallois, A. 2006. *Capiscum*, In CRC Press [ed.]. pp. 185-243.
- Domínguez, M., Ramos, P. L., Echemendía, A. L., Peral, R., Crespo, J., Andino, V., Pujol, M., y Borroto, C. 2002. Molecular Characterization of *Tobacco leaf rugose virus*, a New Begomovirus Infecting Tobacco in Cuba. *Plant Disease*. 86(9): 1050.
- Duffy, S., y Holmes, E. C. 2007. Multiple introductions of the Old World begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* into the New World. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7114-17.
- Echemendía, A. L., Ramos, P. L., Peral, R., Fuentes, A., González, G., Sanpedro, J., y Morales, F. J. 2001. Cuban isolate of *Bean golden yellow mosaic virus* is a member of the Mesomaerican BGYMV group. *Plant Disease*. 85(9): 1030.
- Echemendía, A. L., Ramos, P. L., Peral, R., Fuentes, A., Pujol, M., y González, G. 2003. First report of *Dicliptera yellow mottle virus* (DiYMoV) infecting *Dicliptera vahliana* in Cuba. *Plant Pathology*. 52: 787.
- Echemendía, A. L., Ramos, P. L., Díaz, L., Fuentes, A., Pujol, M., y González, G. 2004. First report of *Sida golden yellow vein virus* infecting *Sida* species in Cuba. *Plant Pathology*. 53(2): 234.

## Referencias Bibliográficas

- Elmer, J. S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W. E., Bisaro, D. M., y Rogers, S. G. 1988. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Res.* 16 14B: 7043-7060.
- EMBRAPA. 2009. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2<sup>da</sup> Ed. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. ISBN 85-85864-04-4. Río de Janeiro. 397p.
- Engel, M., Fernandez, O., Jeske, H., y Frischmuth, T. 1998. Molecular characterization of a new whitefly transmissible bipartite geminivirus infecting tomato in Panama. *Journal of General Virology* 79: 2313-2317.
- EPPO. 2005. Plant quarantine. [www.eppo.org/Quarantine/virus/TYLCV\\_virus/TYLC00\\_map.htm](http://www.eppo.org/Quarantine/virus/TYLCV_virus/TYLC00_map.htm)
- Fancelli, M., Vendramim, J., Lourenção, A. L., y Dias, C. 2003. Atractividade e preferência para ovoposição de *Bermisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: *Aleyrodidae*) Biotipo B em genótipos de tomateiro. *Neotropical Entomology.* 32: 319-328.
- FAOSTAT, 2011. Datos 2010 de producción. Disponible en: [faostat.fao.org/faostat](http://faostat.fao.org/faostat).
- Faria, J. C., Souza-Dias, J. A. C., Slack, S., y Maxwell, D. P. 1997. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease.* 81: 423.
- Faria, J. C., Bezerra, I. C., Zerbini, F. M., Ribeiro, S. G., y Lima, M. F. 2000. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia brasileira.* 25: 125-137.
- Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, F. M., y Zhou, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology.* 153: 783-821.
- Fernandes, J. J., Carvalho, M. G., Andrade, E. C., Brommonschenkel, S. H., Fontes, E. P. B., y Zerbini, F. M. 2006. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology.* 55: 513-522.
- Fernandes, F. R., Albuquerque, L. C., Giordano, L. B., Boiteux, L. S., Ávila, A. C., y Inoue, A. K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes.* 36: 251-258.
- Fiallo, E., Martínez, Y., y Rivera, R. 2009. *Tomato yellow leaf distortion virus*, a new bipartite begomovirus infecting tomato in Cuba. *Plant Pathology.* 58: 785.
- Fiallo, E., Navas, J., Moriones, E., y Martínez, Y. 2010a. Two novel begomoviruses belonging to different lineages infecting *Rhynchosia minima*. *Archives of Virology.* 155: 2053-2058.
- Fiallo, E., Martínez, Y., Moriones, E., y Navas, J. 2010b. Complete nucleotide sequence of *Sida golden mosaic Florida virus* and phylogenetic relationships with other

## Referencias Bibliográficas

- begomoviruses infecting malvaceous weeds in the Caribbean. *Archives of Virology*. 155: 1535-1537.
- Fiallo, E., Hernández, C., Trejo, D., Carrillo, J., Rivera, R. F., y Martínez, Y. 2012a. Complete genome and pathogenicity of *Tomato yellow leaf distortion virus*, a bipartite begomovirus infecting tomato in Cuba. *European Journal of Plant Pathology*. DOI 10.1007/s10658-012-0016-3.
- Fiallo, E., Navas, J., Moriones, E., y Martínez, Z. 2012b. Begomoviruses infecting weeds in Cuba: increased host range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. *Archives of Virology*. DOI 10.1007/s00705-011-1123-8.
- Flores, E., Silberschmidt, K., y Kramer, M. 1960. Observaciones de “clorose infecciosa” das malvaceas en tomateiros do campo. *Biologico*. 26: 65-69.
- Flores, E., y Silberschmidt, K. 1967. Contribution to the problem of insect and mechanical transmission of infectious chlorosis of *Malvaceae* and the disease displayed by *Abutilon thompsonii*. *Phytopathology*. 60: 181-195.
- Fontenelle, M., Luz, D., Gomes, A., Florentino, L., Zerbini, F. M., y Fontes, E. 2007. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato chlorotic mottle virus*. *Virus Research*. 126: 262-267.
- Fontes, E. P., Gladfelter, H. J., Schaffer, R. L., Petty, I. T., y Hanley, L. 1994. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*. 6(3): 405-416.
- Foolad, M. Genome mapping and molecular breeding of tomato. 2007. *International Journal of Plant Genomics*. 2007: 1-52.
- Foolad, M., y Panthee, D. 2012. Marker-Assisted selection in tomato breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 31: 93-123.
- Fraser, R. S. S. 1990. The genetics of resistance to plant virus. *Annual Review of Phytopathology*. 28:179-200.
- Friedmann, M., Lapidot, M., Cohen, S., y Pilowsky, M. 1998. A novel source of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 123(6): 1004-1007.
- Frohlich, D. R., Torres, I., Bedford, I. D., Markham, P. G., y Brown, J. K. 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*. 8: 1683-1691.
- Fuentes, A., Ramos, P. L., Fiallo, E., Callard, D., Sánchez, Y., Peral, R., Rodríguez, R., y Pujol, M. 2006. Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to *Tomato yellow leaf curl virus* infection in transgenic tomato plants. *Transgenic Research*. 15: 291-304.

## Referencias Bibliográficas

- García, S., García, M., Valero, M., Anastasio, G., y Ruiz, J. J. 2004. Estudio de la eficacia de un marcador molecular CAPS en la selección de plantas tolerantes a TYLCV. Actas de Horticultura N 41-II Congreso de Mejora Genética de Plantas, León. p. 115-118.
- García, S., Monci, F., Navas, J., y Moriones, E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology*. 350: 433-442.
- García, B. E., Graham, E., Jensen, K. S., Hanson, P., Mejía, L., y Maxwell, D. P. 2007. Codominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance *Ty-2* locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm. *Tomato Genetic Cooperative Report*. 57: 21-24.
- García, E. 2008. La resistencia como estrategia de control de virus causantes de amarilleamiento en tomate. (Tesis de Doctorado). Universidad de Málaga. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. 233p.
- García, E., Resende, R. O., Boiteux, L. S., Giordano, L. B., Fernández, R., y Moriones, E. 2008. Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology*. 98: 618-627.
- Gennadius, P. 1889. Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. *Ellenike Georgia*. 5: 1-13.
- Ghanim, M. y Czosnek, H. 2000. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-I) is transmitted among whiteflyies (*Bemisia tabaci*) in a sex related manner. *Journal of Virology*. 74: 4738-4745.
- Ghanim, M., y Medina, V. 2007. Localization of Tomato yellow leaf curl virus in its whitefly vector *Bemisia tabaci*. En: Czosnek H, ed. Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 171-183.
- Giordano, L. B., Silva, V. L., Santana, F. M., Fonseca, M., y Boiteux, L. S. 2005a. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica*. 143: 27-33.
- Giordano, L. B., Fonseca, M., Silva, J. B. C., Inoue, A. K., y Boiteux, L. S. 2005b. Efeito da infecção precoce por begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira*. 23: 815-818.
- Goldbach, R., Bucher, E., y Prins, M. 2003. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Research*. 92: 207-212.

## Referencias Bibliográficas

- Gómez, O., y González, G. 1993 Presence of yellow leaf curl disease in Cuba tomato fields. *Tomato leaf curl Newsletter*. 3(3): 1.
- Gómez, O., A. Casanova, H. Laterrot y G. Anaís. 2000. Mejora genética y manejo del cultivo del tomate para la producción en el Caribe. IIHLD (eds.) 152p.
- Gómez, O., Piñón, M., Martínez, Y., Quiñones, M., Fonseca, D., y Laterrot, H. 2004. Breeding for resistance to begomovirus in tropic-adapted tomato genotypes. *Plant Breeding*. 123: 275-279.
- Gómez, P., Rodríguez, A. M., Moury, B., y Aranda, M. A. 2009. Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability. *European Journal of Plant Pathology*. DOI 10.1007/s10658-009-9468-5.
- Gonçales, K. C., Massaharu, J., Navas, J., Agenor, M., y Krause, R. 2010. Ocorrência e variabilidade genética do *Tomato severe rugose virus* em tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*. 36(3): 222-227.
- González, G. 1995. Virus del encrespamiento Amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba. Caracterización, incidencia y elementos de lucha para el programa de manejo integrado en el cultivo del tomate. *Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas*. MINAGRI. 101p.
- González, G., y Valdés, S. 1995. Virus del encrespamiento Amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba. *CEIBA*. 36(1): 103-105.
- González, J. A. 2007. Variabilidade molecular e resistência a geminivírus em acessos de tomateiro do BGH-UFV. (Tesis de Maestría). Viçosa: UFV. 65p
- González, T., Monteverde, E., Marín, C. y Madriz, P. M. 2007. Comparación de tres métodos para estimar la estabilidad del rendimiento en nueve variedades de algodón. Disponible en: [http://www.interciencia.org/v32\\_05/344.pdf](http://www.interciencia.org/v32_05/344.pdf).
- González, J. A. 2011. Caracterização de genes de resistência e begomovirus bipartidos presentes em subamostras de tomateiro do BGH-UFV, e sua resposta em condições de estufa e de campo. (Tesis de Doutorado). Viçosa: UFV. 104p
- González, J., Malta, A. W. O., Flores, M. P., Almeida, V. O., Nick, C., Xavier, C. A. D., Silva, D. J. H., y Zerbini, F. M. 2011. Characterization of the resistance of tomato accessions from the BGH-UFV to the geminivírus *Tomato yellow spot virus*. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*. 1(1): 66-70.
- González, J. M., Tomás. D. M., Lorente. I., Abad. J., Fernández. R., Moriones. E., y Lozano. R. 2007. Marcadores Moleculares ligados a la resistencia a TYLCD en tomate. *Acta de Horticultura*. 2007, n<sup>o</sup> 48. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. ISBN: 978-84-690-5619-6.

## Referencias Bibliográficas

- Gorovits, R., Akad, F., Beery, H., Vidavsky, F., Mahadav, A., y Czosnek, H. 2007. Expression of stress-response proteins upon whitefly-mediated inoculation of *Tomato yellow leaf curl virus* in susceptible and resistant tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20(11): 1376-1383.
- Gorovits, R., y Czosnek, H. 2007. Biotic and abiotic stress responses in tomato breeding lines resistant and susceptible to *Tomato yellow leaf curl virus*. En: Czosnek H, ed. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 223-237.
- Green, S. K., y Shanmugasundaram, S. 2007. AVRDC's international networks to deal with the tomato yellow leaf curl disease: the needs of developing countries. En: Czosnek H, ed. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 417-439.
- Green-Seeds. 2007. [online] [consultado 22 de enero de 2009] Disponible en: <<http://www.green-seeds.com>>
- Gronenborn, B. 2007. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Genome and Function of its Proteins. En *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease* (Czosnek, H., ed): Springer Netherlands, pp. 67-84.
- Gutiérrez, C., Ramírez, E., Mar, C. M., Sanz, A. P., Luque, A., y Missich, R. 2004. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology*. 98(2): 111-119.
- Hanley, L., Settlage, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S., y Robertson, D. 2000. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 35(2): 105-140.
- Hanson, P. M., Bernacchi, D., Green, S., Tanksley, S. D., Muniyappa, V., Padmaja, A. S., Chen, H. M., Kuo, G., Fang, D., y Chen, J. T. 2000. Mapping a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 125: 15-20.
- Hanson, P. M., Grenn. S. K., y Kuo, G. 2006. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetic Cooperative Report*. 56: 17-18.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., y Thomma, B. P. H. J. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23 (5): 539-548.
- Hassan, A. A., Mazayd, H. M., Moustafa, S. E., Nassar, S. H., Nakhla, M. K., y Sims, W. L. 1984. Inheritance of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon cheesmanii* and *Lycopersicon hirsutum*. *Hort Science*. 19: 574-575.

## Referencias Bibliográficas

- Hernández, Y. 2001. Biotype identification of whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) by the RAPD-PCR technique. *Protección Vegetal*. 16(1): 66.
- Hernández, A., Ascanio, M. O., Morales, M., y Cabrera, A. 2005. Correlación de la nueva versión de clasificación internacional de los suelos de Cuba con las clasificaciones internacionales y nacionales: Una herramienta para la investigación, docencia y producción agropecuaria. La Habana, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA); 60p.
- Hoekema, A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir and Tregion of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 303: 179-180.
- Hogenhout, S. A., Ammar, E. D., Whitfield, A. E., y Redinbaugh, M. G. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 46: 327-59.
- Hull, R. 1989. The movement of viruses in plants. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 213-240.
- Hutton, S. F., Scott, J. W., y Schuster, D. J. 2011. Recessive begomovirus resistance from the *Solanum Lycopersicum* cv. 'Tyking' is conferred by the *Ty-5* locus. 26<sup>th</sup> Annual Tomato Disease Workshop. Oct 11-13. Cornell University. Disponible en [http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/TDW/Presentations/10%20Hutton\\_TD\\_W\\_2011.pdf](http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/TDW/Presentations/10%20Hutton_TD_W_2011.pdf)
- Hutton, S. F., Scott, J. W., y Schuster, D. J. 2012. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *Ty-5* on chromosome 4. *Hort Science*. 47: 324-327.
- Inoue, A. K., Martin, D. P., Boiteux, L. S., Giordano, L. D., Bezerra, I. C., y de Avila, A. C. 2006. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41: 1329-1332.
- Inoue, A. K., Nagata, T., Ávila, A. C., y Giordano, L. B. 2007. A reliable begomovirus inoculation method for screening *Lycopersicon esculentum* lines. *Horticultura Brasileira*. 25(3): 447-450.
- Jeske, H. 2007. Replication of geminiviruses and the use of rolling circle amplification for their diagnosis. En: Czosnek H, ed. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 141-156.
- Ji, Y. F., y Scott, J. W. 2006. Development of breeder friendly markers for begomovirus resistance genes derived from *S. chilense*. Proc Tomato Breeders Roundtable, Tampa, FL, USA, roundtable06.ifas.ufl.edu/schedule.htm.

## Referencias Bibliográficas

- Ji, Y. F., Schuster, D. J., y Scott, J. W. 2007a. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*. 20: 271-284.
- Ji, Y. F., Scott, J. W., Hanson, P., Graham, E., y Maxwell, D. P. 2007b. Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato-infecting begomoviruses. En: Czosnek H (ed) Tomato yellow leaf curl virus disease: management, molecular biology and breeding for resistance. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 343-362.
- Ji, Y. F., Scott, W., Maxwell, D., y Schuster, D. 2009a. Molecular mapping of *Ty-4*, a new tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 134: 281-288.
- Ji, Y. F., Scott, J. W., y Schuster, D. 2009b. Toward fine mapping of the Tomato yellow leaf curl virus resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato. *Hort Science*. 44(3): 614-618.
- Jiménez, E., Gutiérrez, W., y González, C. 2010. Evaluación de cuatro variedades de tomate industrial (*S. lycopersicum* L) en el rendimiento y tolerancia al complejo mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius)- Geminivirus. La Calera. Agronomía UNA. pp. 5-15. Disponible en: [http://www.una.edu.ni/diep/calera/download\\_pdf/Calera\\_Inv-CAL93\\_Num- Ano-2010.pdf](http://www.una.edu.ni/diep/calera/download_pdf/Calera_Inv-CAL93_Num- Ano-2010.pdf)
- Jones, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 195-219.
- Jones, D. J., y Dangl, J. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329.
- Kaloo, G., y Banerjee, M. K. 1990. Transfer of tomato leaf curl virus resistance from *Lycopersicon hirsutum f. glabratum* to *L. esculentum*. *Plant Breeding*. 105: 156-159.
- Kasrawi, M. A. 1989. Inheritance of resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Plant Disease*. 73: 435-437.
- Khan, A. J., Idris, A. M., Al-Saady, N. A., Al-Mahruki, M. S., Al-Subhi, A. M., y Brown, J. K. 2008. A divergent isolate of *Tomato yellow leaf curl virus* from Oman with an associated DNA \_ satellite: an evolutionary link between Asian and the Middle Eastern virus-satellite complexes. *Virus Genes*. 36: 169-176.
- Kheyr, A., Gronenborn, B., y Czosnek, H. 1994. Agroinoculation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) overcomes the virus resistance of wild *Lycopersicon* species. *Plant Breeding*. 112: 228-233.
- Lacerda, J. T., y Carvalho, R. A. 2008. Descrição e manejo integrado da mosca-branca (*Bemisia* spp.) transmissora de geminivirus em culturas econômicas. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*. 2(2): 15-22.

## Referencias Bibliográficas

- Lapidot, M., Friedmann, M., Lachman, O., Yehezkel, A., Nahon, S., Cohen, S., y Pilowsky, M. 1997. Comparison of resistance level to Tomato yellow leaf curl virus among comercial cultivars and breeding lines. *Plant Disease*. 81: 1425-1428.
- Lapidot, M., Golray, O., Ben-Joseph, R., Cohen, S., Friedmann, M., Sholmo, A., Nahon, S., Chen, L., y Pilowsky, M. 2000. Breeding tomatoes for resistance to *Tomato yellow leaf curl begomovirus*. EPPO Bulletin 30: 317-321.
- Lapidot, M. y Friedmann, M. 2002. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology*. 140: 109-127.
- Lapidot, M., Ben-Joseph, R., Cohen, L., Machbash, Z., y Levy, D. 2006. Development of a scale for evaluation of *Tomato yellow leaf curl virus* resistance level in tomato plants. *Phytopathology*. 96: 1404-1408.
- Lapidot, M. 2007. Screening for TYLCV-resistant plants using whitefly-mediated inoculation. En: Czosnek H, ed. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 329-342.
- Lapidot, M., Weil, G., Cohen, L., Segev., L., y Gaba, V. 2007. Biolistic inoculation of plants with *Tomato yellow leaf curl virus* DNA. *Journal of Virological Methods*. 144: 143-148.
- Lastra, J. R., y Uzcategui, R. C. 1975. Viruses affecting tomatoes in Venezuela. *Phytopathology*. 84: 253-258.
- Lastra, J. R., y Gil, F. 1981. Ultrastructural host cell changes associated with tomato yellow mosaic. *Phytopathology*. 71: 524-528.
- Laterrot, H. 1992. Resistance genitors to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato Yellow Leaf Curl Newsletter*. 1: 2-4.
- Laterrot, H., y A. Moretti. 1994. The Chillylic populations of the EEC-DGX programme. *Tomato Leaf Curl Newsletter*. 5: 2.
- Laterrot, H. 1995. Breeding network to create tomato varieties resistant to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Fruits*. 50: 439-444.
- Latterot, H. 2002. Breeding strategies for disease resistance in tomatoes with emphasis on the tropics: Current status and research challenges. 1<sup>st</sup> Int. Symp. on Tropical Tomato Disease. Brasil. p 126-132.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S. G., Schell, J., y Gronenborn, B. 1995. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(9): 3879-3883.

## Referencias Bibliográficas

- Lazarowitz, S. G., Wu, L. C., Rogers, S. G., y Elmer, J. S. 1992. Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell*. 4(7): 799-809.
- Levy, D., y Lapidot, M. 2008. Effect of plant age at inoculation on expression of genetic resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Archives of Virology*. 153: 171-179.
- Loconsole, G., Fatone, M.T., y Savino, V. 2009. Specific Digoxigenin-labelled riboprobes for detection of *Citrus psorosis virus* and *Citrus variegation virus* by molecular hybridization. *Journal of Plant Pathology*. 91(2): 311-319.
- Lourenção, A. L., Melo, A. M., Siqueira, W. L., Colariccio, A., y Melo, P. C. 2004. Avaliação da resistência de acessos de tomateiro a tospovirus e a geminivirus. *Horticultura Brasileira*. 22: 193-196.
- Marín, F. M. 2004. Búsqueda de estrategias de control frente a los begomovirus que afectan a tomate y judía en España. (Tesis Doctoral). Universidad de Córdoba. Algarrobo-Costa. España. 250p.
- Martínez, Z. Y., Zabalgogezcoa, I., Blas, C., Sanchez, F., Peralta, E. L., Ponz, F., y Romero, J. 1996. Geminivirus associated with diseased tomatoes in Cuba. *Journal of Phytopathology*. 144: 277-279.
- Martínez, Y., de Blas, C., Zabalgogezcoa, I., Quiñones, C., Castellano, C., Peralta, E. L., y Romero, J. 1997. A bipartite geminivirus infecting tomatoes in Cuba. *Plant Disease*. 81: 1215.
- Martínez, Y. 1998. Contribución al conocimiento de geminivirus que afectan el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*) en Cuba. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. CENSA, La Habana. 119 p.
- Martínez, Y., de Blas, C., Quiñones, M., Castellanos, C., Peralta, E. L. y Romero, J. 1998. Havana tomato virus, a new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Cuba. *Archives of Virology*. 143: 1757-1772.
- Martínez, Y., Fonseca, D., Quiñones, M., y Peralta, E. L. 2001. Evaluación de parámetros analíticos para la detección molecular de geminivirus que afectan el cultivo del tomate en Cuba. *Protección Vegetal*. 16(1): 55-61.
- Martínez, Y., Quiñones, M., y Fonseca, D. 2003. National survey of tomato begomovirus in Cuba. *Protección Vegetal*. 18(3): 168-175.
- Martínez, Y., Fonseca, D., Quiñones, M., y Palenzuela, I. 2004. Presence of *Tomato yellow leaf curl virus* infecting squash (*Cucurbita pepo*) in Cuba. *Plant Disease*. 88: 572.
- Martínez, Y., Quiñones, M., Palenzuela, I., y Muñiz, Y. 2006. Diversidad de begomovirus presentes en Cuba. *Protección Vegetal*. 21(3): 149-154.

## Referencias Bibliográficas

- Martínez, Y. 2007. Individual partner report. Final Report BETOCARIB ICA4-2001-10002: 56-75. Disponible en: <http://betocarib.cirad.fr>.
- Martínez, Y. 2008. Emergence of Begomovirus in Cuba. *Protección Vegetal*. 23(1): 11-15.
- Martínez, A. K., Morales, F. J., y Vallejo, F. A. 2008. Caracterización molecular de un begomovirus del tomate en el Valle del Cauca, Colombia, y búsqueda de fuentes de resistencia para el mejoramiento de la variedad Unapal Maravilla. *Acta Agronómica*, 57(3): 167-173.
- Martínez, Y., Martínez, M. A., Quiñones, M., Miranda, I., Holt, J., y Chancellor, T. 2009. Estudios de factores que influyen en la epifitología del complejo mosca blanca-geminivirus en la región oriental de Cuba. *Protección Vegetal*. 24(1): 47-50.
- Martins, A. T. 2008. Caracterização de dois begomovírus (*Tomato severe rugose virus e Tomato yellow vein streak virus*) que infectam tomateiro e obtenção de clones infecciosos. (Tesis de Maestría).Viçosa: UFV. 86p
- Maruthi, M. N., Czosnek, H., Vidavsky, F., Tarba, S. Y., Milo, J., Leviatov, S., Venkatesh, H. M., Padmaja, A. S., Kulkarni, R. S., y Venkataramappa, M. 2003. Comparison of resistance to tomato leaf curl virus (India) and tomato yellow leaf curl virus (Israel) among *Lycopersicon* wild species, breeding lines and hybrids. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 1-11.
- Matos, E. S., Siqueira, W. J., Lourenção, A. L., Melo, A. M. T., Sawazaki, H. E., Souza, J. A. C., y Colariccio, A. 2003. Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 159-165.
- Maule, A. J., Caranta, C., y Boulton, M. I. 2007. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology*. 8: 223-231.
- Mayo, M. A., Leibowitz, M. J., Palukaitis, P., Scholthof, K. B. G., Simon, A. E., y Stanley, J. T. M. 2005. Satellites., *Virus Taxonomy*. Elsevier/Academic Press, London. pp. 1163-1169.
- Maytis, J. C., Silva, D. M., Oliveira, A. R., y Costa, A. S. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*. 1: 267-275.
- Mc Auslane, H. J. 2007. *Bemisia tabaci*. University of Florida, EENY-129.
- Mc Glashan, D., Polston, J. E. y Bois, D. 1994. Tomato yellow leaf curl geminivirus in Jamaica. *Plant Disease*. 78: 1219.

## Referencias Bibliográficas

- Mc Grath, P., y Harrison, B. 1995. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci*: effects of virus isolate and vector biotype. *Annals of Applied Biology*. 126: 307-316.
- Mehta, P., Wyman, J. A., Nakhla, M. K., y Maxwell, D. P. 1994. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*. 87: 1291-1297.
- Mejía, L., Teni, R. E., Vidavsky, F., Czosnek, H., Lapidot, M., Nakhla, M. K., y Maxwell, D. P. 2005. Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for resistance to begomoviruses in Guatemala. *Acta Horticulturae*. 695: 251-255.
- Mendoza, F. 2009. Liberan nueva variedad de semillas de tomate. El Nuevo Diario. Disponible en: El Nuevo Diario.com.ni Fecha de consulta [7 de septiembre de 2009].
- Michelson, I., Zamir, D., y Czosnek, H. 1994. Accumulation and translocation of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gen *Ty-1*. *Phytopathology*. 84: 928-933.
- Momotaz, A., Scott, J. W., y Schuster, D. J. 2005. Searching for silver leaf whitefly and begomovirus resistance genes from *Lycopersicon hirsutum* accession LA1777. *Acta Horticulturae*. 695: 417-422.
- Morales, F. J., y Anderson, P. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*. 146: 415-441.
- Morales, F. J., Martínez, A. K., y Velasco, A. C. 2003. Nuevos brotes de begomovirus en Colombia. *Fitopatología Colombiana*. 26(1): 75-79.
- Morales, F. J., y Jones, P. G. 2004. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*. 100: 57-65.
- Morales, F. J. 2006. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Advances and Virus Research*. 67: 127-162.
- Morales, F. J., Cardona, C., Bueno, J. M., Rodríguez, I. 2006. Manejo integrado de enfermedades de plantas causadas por virus transmitidos por moscas blancas. CIAT. Cali, Colombia. 43p.
- Morales, F. J., Tamayo, P. J., Castaño, M., Olaya, C., Martínez, A. K., y Velasco, A. C. 2009. Enfermedades virales del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Colombia. *Fitopatología Colombiana*. 33(1): 23-27.
- Morales, F. J. 2010. Distribution and dissemination of begomoviruses in Latin America and the Caribbean. See Ref. 167, pp. 283-318.
- Morilla, G., Janssen, D., García, S., Moriones E., Cuadrado, I. M., y Bejarano, E. R. 2005. Pepper (*Capsicum annum*), is a dead-end host for *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Phytopathology*. 95: 1089-1097.

## Referencias Bibliográficas

- Moriones, E., y Navas, J. 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*. 71: 123-134.
- Mound, L. A. 1963. Host correlated variation in *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: *Aleyrodidae*). En: proceedings of the Royal Entomological Society of London (A). 38: 171-180.
- Muñiz, Y., Martínez, Y., Martínez, M. A., Fonseca, D., Granier, M. y Pitterschmitt, M. 2006. Caracterización molecular de poblaciones cubanas de *B. tabaci* (GENNADIUS). *Protección Vegetal*. 21(3):163-169.
- Murashige, T., y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15: 473-497.
- Murguido, C., y Elisondo, A.I. 2007 El manejo integrado de plagas de insectos en Cuba. *Fitosanidad*. 11(3): 23-28.
- Navas, J., Fiallo, E., y Sánchez, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*. 49: 15.1-15.30.
- Niks, R. E. y Lindhout, W. H. 2004. Curso sobre mejoramiento para resistencia a enfermedades y plagas. Tercera edición. Wageningen University. The Netherlands, Quito, Ecuador, 216p.
- Nizio, D. A. C., Maluf, W. R., Figueira, A. R., Nogueira, D. W., Silva, V. F., y Gonçalves, A. C. 2008. Caracterização de genótipos de tomateiro resistentes a begomovírus por marcador molecular co-dominante ligado ao gene *Ty-1*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43(12): 1699-1705.
- Nogueira, D. G., Maluf, W. R., Nogueira, D. W., Mascarenhas, G., Vilela, L., y dos Reis, A. 2011. Marcador microsatélite associado ao alelo *Ty-1* de resistencia a Begomovirus em tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 46(4): 412-419.
- Nakada, D., Krause, R., Hasegawa, J. M., Cezar, M. A., Dziuba, P. H., y Pavan, M. A. 2006. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 31(3): 5040.
- Nakada, D., Krause, R., y Pavan, M. A. 2010. Begomovírus infectando a cultura de pimentão no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*. 36: 244-247.
- Nuez, F. 1995. Desarrollo de nuevos cultivares. En: El cultivo del tomate. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. p. 625-669.
- Ojito, K., y Portal, O. 2010. Introducción al sistema inmune en plantas. *Bioteχνología Vegetal*. 10: 3-19.
- Orozco, B. M., y Hanley, L. 1998. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 448-456.

## Referencias Bibliográficas

- Padidam, M., Sawyer, S., y Fauquet, C. M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*. 265(2): 218-225.
- Palukaitis, P., y Carr, J. P. 2008. Plant resistance responses to virus. *Journal of Plant Pathology*. 90(2): 153-171.
- Peralta, I. E., y Spooner, D. M. 2005. GBSSI gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum L.* section *Lycopersicon* (Mill) Wettst. Subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany*. 88: 1888-1902.
- Peralta, I. E., Knapp, S., y Spooner, D. M. 2006. New species of wild tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*. 30(2): 424-434.
- Pereira, R. 2009. Expressão fenotípica e mecanismos de ação de genes envolvidos na resistência ampla a begomovírus monopartidos y bipartidos em tomate. (Tese de Doutorado). Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Fitopatologia. Brasília, 173p.
- Pérez, A., Díez, M. J., y Nuez, F. 2004. Identificación de nuevas fuentes de resistencia al Virus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV). *Actas de Horticultura*. 41: 119-122.
- Pérez, A., Díez, M. J., y Nuez, F. 2005. Evaluation of breeding tomato lines partially resistant to *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon chilense*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 27: 268-275.
- Pérez, A., Díez, M. J., y Nuez, F. 2007a. Inheritance of Tomato yellow leaf curl virus resistance derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV16991. *Plant Disease*. 91: 879-885
- Pérez, A., Díez, M. J., y Nuez, F. 2008. Exploiting partial resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV 16991. *Plant Disease*. 92: 1083-1090.
- Pérez, A., Díez, M. J. y Nuez, F. 2007b. Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *European Journal of Plant Pathology*. 117: 347-356.
- Pérez, J. 2010. Programa integral de cultivos varios. Proyección estratégica hasta el 2015. Editora Liliana ISBN 978-959-7111-55-9. La Habana-Cuba Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". p. 95.
- Perring, T. M., Cooper, A. D., Rodríguez, R. J., Farrar, C. A., y Bellows, T. S. 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioural studies. *Science*. 259: 74-77.

## Referencias Bibliográficas

- Peterschmitt, M. 2007. Individual partner report. Final Report BETOCARIB ICA4-2001-10002: 37-40. Disponible en: <http://betocarib.cirad.fr>.
- Picó, B., Díez, M. J., y Nuez, F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II The tomato yellow leaf curl virus- a review. *Scientia Horticulturae*. 67: 151-196.
- Picó, B., Díez, M. J., y Nuez, F. 1998. Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Euphytica*. 101: 259-271.
- Picó, B., Sifres, A., Elía, M., Díez, M. J., y Nuez, F. 2000. Searching for new resistance sources to *Tomato yellow leaf curl virus* within a highly variable wild *Lycopersicon* genetic pool. *Acta Physiologiae Plantarum*. 22: 344-350.
- Picó, B., Ferriol, M., Díez, M. J. y Nuez, F. 2001. Agroinoculation methods to screen wild *Lycopersicon* for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Plant Pathology*. 83: 215-220.
- Pilowsky, M., y Cohen, S. 1974. Inheritance of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* in tomatoes. *Phytopathology*. 64: 632-635.
- Pilowsky, M., Cohen, S., Ben Joseph, R., Shlomo, A., Chen, L., Nahon, S., y Krikun, J. 1989. Ty-20 a tomato cultivar tolerant to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Hassadeh*. 69: 1212-1215.
- Pilowsky, M. y Cohen, S. 1990. Tolerance *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Disease*. 74: 248-250.
- Piñón, M. y Gómez, O. 2003. Nuevos híbridos de tomate, tolerantes al TYLCV. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 68: 85-88.
- Piñón, M., Gómez, O., y Cornide, M. T. 2005. RFLP analysis of Cuban tomato breeding lines with resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Acta Horticulturae*. 695: 273-276.
- Piñón, M. 2009. Obtención de líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) resistentes al virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba. (Tesis de Doctorado). Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova (IIHLD). 126p.
- Pietersen, G., y Smith, M. F. 2002. Tomato yellow leaf curl virus resistant tomatoes show resistance to Tomato curly stunt virus. *Plant Disease*. 86: 528-534.
- Polston, J. E., Bois, D., Serra, C. A., y Concepción, S. 1994. First report of a Tomato yellow leaf curl-like geminivirus from tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease*. 78: 831.

## Referencias Bibliográficas

- Polston, J. E. y Anderson, P. K. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease*. 81(12): 1358-1369.
- Polston, J. E., Bois, D., Ano, G., Poliakoff, N., y Urbino, C. 1998. Occurrence of a new strain of potato yellow mosaic geminivirus infecting tomato in the eastern Caribbean. *Plant Disease*. 82: 126.
- Polston, J. E., Mc Govern, R. J., y Brown, L. G. 1999. Introduction of *Tomato yellow leaf curl virus* in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. *Plant Disease*. 83: 984-988.
- Pradeep, S., y Masato, I. 2010. Tomato leaf curl Java virus V2 protein is a determinant of virulence, hypersensitive response and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Virology*. 396(1): 85-93.
- Quiñones, M. 2002. Distribución, variabilidad genética y perfeccionamiento del sistema de diagnóstico molecular del Virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. CENSA. La Habana. 138p.
- Quiñones, M., Fonseca, D., y Martínez, Y. 2004. Comparación de métodos de hibridación de ácidos nucleicos para el diagnóstico del Virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba. *Protección Vegetal*. 19(1): 26-32.
- Quiñones, M., Fonseca, D., y Martínez, Y. 2007. Caracterización molecular de aislados de campo del virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV). *Protección Vegetal*. 22(1): 47-56.
- Quirós, C. F. 2001. Markers and their applications. VC2221: Tomato. Disponible en: [www.veghome.ucdavis](http://www.veghome.ucdavis). Última actualización: spring 2001, Fecha de consulta: Febrero 2, 2002.
- Ramos, P. L., Guerra, O., Dorestes, V., Ramírez, N., Rivera, R., y Oramas, P. 1996. Detection of TYLCV in Cuba. *Plant Disease*. 80(10): 1208.
- Ramos, P. L., Guerra, O., Peral, R., Oramas, P., Guevara, R. G., y Rivera, R. 1997. *Taino tomato motle virus*, a new bipartite Geminivirus from Cuba. *Plant Disease*. 81: 1095.
- Ramos, P. L., Fernández, A. I., Castrillo, G., Díaz, L., Echemendía, A. L., Fuentes, A., Peral, R., Pujol, M., Ascencio, J. T., Rivera, R., y Arguello, G. 2002. *Macroptilium yellow mosaic virus*, a New Begomovirus Infecting *Macroptilium lathyroides* in Cuba. *Plant Disease*. 86(9): 1049.
- Ramos, P. L., Guevara, R. G., Peral, R., Ascencio, J. T., Polston, J. E., Arguello, G. R., Vega, J. C., y Rivera, R. F. 2003. *Tomato motlle Taino virus* pseudorecombines with

## Referencias Bibliográficas

- PYMV but not with ToMoV: implications for the delimitation of cis-and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology*. 148: 1697-1712.
- Ramos, P. L. 2004. Identificación y caracterización biológica y molecular de una nueva especie de begomovirus bipartito: Tomato mottle Taino virus. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Departamento de Plantas. Laboratorio de Virología Vegetal. Ciudad de la Habana. 139p.
- Rampersad, S. N., y Umaharan, P. 2003. Identification of resistance to potato yellow mosaic virus-Trinidad isolate (PYMV-TT) among *Lycopersicon* species. *Plant Disease*. 87: 686-691.
- Ribeiro, A. C., Guimarães, P. T. G., y Álvarez, V. 1999. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais- 5ª aproximação. Viçosa: CFSEMG. 359p.
- Ribeiro, S. G., Ambrozevicus, L. P., Ávila, A. C., Bezerra, I. C., Calegario, R. F., Fernandes, J. J., Lima, M. F., Mello, R. N., Rocha, H., y Zerbini, F. M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*. 148: 281-295.
- Ribeiro, S. G., Martin, D. P., Lacorte, C., Simões, I. C., Orlandini, D. R. S., y Inoue, A. K. 2007. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology*. 97: 702-711.
- Rocha, K. C., Krause, R., Agenor, M., Fugito, R., Gioria, R., y Atsushi, V. 2012. Avaliação de danos causados pelo *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em cultivares de pimentão. *Summa Phytopathologica*. 38(1): 1 87-89.
- Roditakis, E., Roditakis, N. E., y Tsagkarakou, A. 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest. Manag. Sci.* 61: 577-582.
- Rojas, M. R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle, B., Sudarshana, M. R., Lucas, W. J., y Gilbertson, R. L. 2001. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology*. 291 (1): 110-125.
- Rojas, A. 2005. A complex of begomoviruses affecting tomato crops in Nicaragua. In *Proceedings IX International Plant Virus Epidemiology Symposium*, p. 72. Lima, Peru.
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., y Gilbertson, R. L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 361-394.

## Referencias Bibliográficas

- Rom, M., Antignus, Y., Gidoni, D., Pilowsky, M., y Cohen, S. 1993. Accumulation of tomato yellow leaf curl virus DNA in tolerant and susceptible tomato lines. *Plant Disease*. 77: 253-257.
- Roye, M. E., Wernecke, M. E., McLaughlin, W. A., Nakhla, M. K., y Maxwell, D. P. 1999. Tomato dwarf leaf curl virus, a new bipartite geminivirus associated with tomatoes and peppers in Jamaica and mixed infection with *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Pathology*. 48: 370-378.
- Rybicki, E. P., Briddom, R.W., Brown, J. k., Fauquet, C. M., Maxwell, D. P, Harrison, B. D., Markham, P. G., Bisaro, D. M., Robinson, D. y Stanley, J. 2000. In Family Geminiviridae. In "Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." .M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E. B. Carstens, M.K Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R. B. Wickner, Eds.. Academic Press, San Diego, California. pp: 285-297.
- Salus, M. S., y Maxwell, D. P. 2006. Application of molecular techniques for detection of disease resistance genes in tomato breeding lines for Guatemala. [www.plantpath.wisc.edu/InVirLab/docs/Research%20proposal%20for%20Mindy.pdf](http://www.plantpath.wisc.edu/InVirLab/docs/Research%20proposal%20for%20Mindy.pdf)
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2da Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. U.S.A.
- Sánchez, S., Navas, J., Camero, R., Soria, C., Díaz, J. A., y Moriones, E. 1999. Displacement of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology*. 89: 1038-1043.
- Santana, F. M., Ribeiro, S. G., Moita, A. W., Moreira, D. J., y Giordano, L. B. 2001. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica*. 122: 45-51.
- Santos, C. D., Àvila, A. C., y Resende, R. O. 2003. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 664-673.
- Scott, J. W., y Schuster, D. J. 1991. Screening of accessions for resistance to the Florida tomato geminivirus. *Tomato Genetic Cooperative Report*. 41.
- Scott, J. W., Stevens, M. R., Barten, J. H. M., Thome, C. R., Polston, J. E., Schuster, D. J., y Serra, C. A. 1996. Introgression of resistance to whitefly-transmitted geminiviruses from *Lycopersicon chilense* to tomato. In D. Gerling and R. T. Mayer [eds.], Bemisia: Taxonomy, Biology, Damage Control and Management, pp. 357-367.
- Scott, J. W. 2006. Breeding for resistance to viral pathogens. En: Genetic Improvement of Solanaceous Crops Vol. 2: Tomato. M. K. Razdan and Antur K. Mattoo (eds.) Science Publishers, Enfield, USA.

## Referencias Bibliográficas

- Scott, J. W. 2007. Breeding for Resistance for virus pathogens. In: Genetic Improvement of Solanaceous Crops, 2007, vol. 2: Tomato. Ed. Science Publishers, Enfield, NH, USA. Razdan, M.K., Mattoo, A.K. (eds.), p.457-485.
- Scott, J. W., Workman, P. J., Drayton, G. M., y Burnip, G .M. 2007. First record of *Bemisia tabaci* biotype Q in New Zeland. *New Zeland Plant Protection*. 60: 264-270.
- Seal, S. E., Van Den Bosch, F., y Jeger, M. J. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25: 23-46.
- SOL GENOMICS NETWORK. International Solanaceae Genome Project (SOL): systems approach to diversity and adaptation. Disponible en: <<http://solgenomics.net/solanaceae□project/index.pl>>. Acceso el: 20 jun. 2010.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stanley, J. 2004. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. *Veterinary Microbiology*. 98: 121-29.
- Stansley, P. A., Sánchez, P. A., Rodríguez, J. M., Cañizarez, F., Nieto, A., López, M. J., Fajardo, M., Suarez, V., y Urbaneja, A. 2004. Prospects of biological control of *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae) in greenhouse tomatoes of southern Spain. *Crop protection*. 23(8): 701-712.
- Stanley, J., Bisaro, D. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Fauquet, C. M., Harrison, B. D., Rybicki, E. P., y Stenger, D. C. 2005. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet CM; Mayo MA; Maniloff J; Desselberger U; Ball LA (eds) *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press. p. 301-326.
- Taylor, R. A. J., Shalhevet, S., Spharim, I., Berlinger, M. J., y Lebiush, S. 2001. Economic evaluation of insect-proof screens for preventing *Tomato yellow leaf curl virus* of tomatoes in Israel. *Crop Protection*. 20: 561-569.
- Toscano, L. C., Boica, A. L., y Maruyama, W. I. 2002. Non preference of whitefly for oviposition in tomato genotypes. *Scientia Agricola*. 59: 677-681.
- Tripathi, S., y Varma, A. 2002. Identification of sources of resistance in *Lycopersicon* species to *Tomato leaf curl geminivirus* (ToLCV) by agroinoculation. *Euphytica* 129: 43-52.
- Tsai, W., Shih, S., Kenyon, L., Green, S., y Jan, F. 2011. Temporal distribution and pathogenicity of the predominant tomato-infecting begomoviruses in Taiwan. *Plant Pathology*. 60: 787-799.

## Referencias Bibliográficas

- Ueda, S., y Brown, J. K. 2006. First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Japan by mitochondrial cytochrome oxidase I sequence analysis. *Phytoparasitica*. 34: 405-411.
- Urbino, C., Polston, J. E., Patte, C. P., y Caruana, M. L. 2004. Characterization and genetic diversity of *Potato yellow mosaic virus* from the Caribbean. *Archives of Virology*. 149: 417-424.
- Van der Plank, J. E. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic Press, New York, USA.
- Varma, A., y Malathi, V. G. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*. 142: 145-164.
- Vázquez, L. L. 1995. Sistema de diagnóstico, inventario y plantas hospederas de moscas blancas en Cuba. Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana. 121p.
- Verdecia, A., Sueiro, L., Gómez, O., Puerta, A., Bruqueta, D., Blaya, R., Guerrero, C., Gloria, D., De Souza, A., y Ayra, R. 2003. Validación de la variedad de tomate "Vyta" para consumo fresco, con resistencia a geminivirus en áreas productoras de la provincia Granma (Cuba). *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, ISSN 0300-5755, N° 344. 2003. p. 51-54. Disponible en: <<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=621222>>
- Vidavsky, F., y Czosnek, H. 1998. Tomato breeding lines immune and tolerant to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology*. 88: 910-914.
- Vidavsky, F., Leviačov, S., Milo, J., Rabinowitch, H. D., Kedar, N., y Czosnek, H. 2006. Behaviour of tolerant tomato breeding lines (*Lycopersicon esculentum*) originated from three different sources (*L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium* and *L. chilense*) upon early controlled inoculation by tomato yellow leaf curl virus. *Plant Breeding*. 117: 165-169.
- Vidavsky, F., Czosnek, H., Gazit, S., Levy, D., y Lapidot, M. 2008. Pyramiding of genes conferring resistance to Tomato yellow leaf curl virus from different wild tomato species. *Plant Breeding*. 127: 625-631.
- Viscarret, M. M., Torres-Jerez, I. I., Agostini de Manero, E., López, S. N., Botto, E. E., y Brown, J. K. 2003. Mitochondrial DNA evidence for a distinct New World group of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous to Argentina and Bolivia, and presence of the Old World B Biotype Argentina. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 96: 65-72.

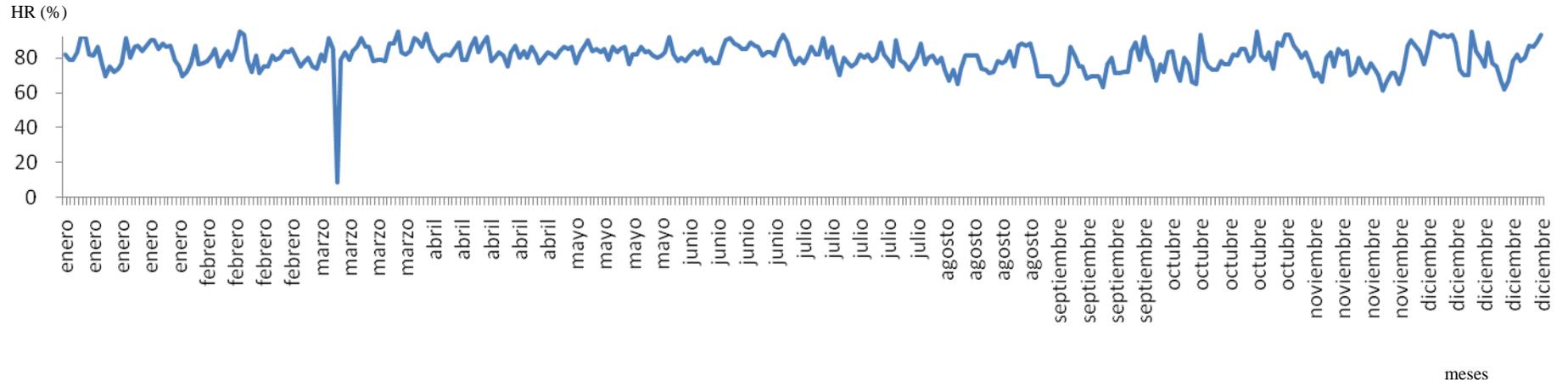
## Referencias Bibliográficas

- Webster, C., Wylie, S. J., y Jones, M. G. K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Current science*. 86(12): 1604-1607.
- Were, H. K., Winter, S., y Maiss, E. 2004. Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease*. 88: 17-22.
- Wyatt, S. D. y Brown, J. K. 1996. Detection of subgroup III Geminivirus Isolates in Leaf Extracts by degenerate primers and Polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 86(12): 1288-1293.
- Yadava, P., Suyal, G., y Kumar, S. 2010. Begomovirus DNA replication and pathogenicity. *Current science*. 98(39): 360-368.
- Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Kedar, N., Rabinowitch, H., Czosnek, H. y Zamir, D. 1991. Screening of *Lycopersicon* accessions for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*: presence of viral DNA and symptom development. *Plant Disease*. 75: 279-281.
- Zamir, D., Michelson, I., Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Sarfatti, M., Eshed, Y., Harel, E., Pleban, E., van-Oss, T., Kedar, N., Rabinowitch, H. D. y Czosnek, H. 1994. Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics*. 88: 141-146.
- Zerbini, F. M., Carvalho, M. G., y Zambolim, E. M. 2006. Estratégias de replicação do genoma viral. En: Zerbini, F. M; Carvalho, M. G; Zambolim, E. M. Introdução à virologia vegetal. 2<sup>ed.</sup>, Viçosa: UFV, 2006. Cap. 5, p. 41-62.
- Zhou, X. P., Xie, Y., Tao, X. R., Zhang, Z. K., Li, Z. H., y Fauquet, C. M. 2003. Characterization of DNA beta associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. *Journal of General Virology*. 84: 237-247.
- Zúñiga, C., y Ramírez, P. 2002. Los geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo Integrado de Plagas*, 25-33.

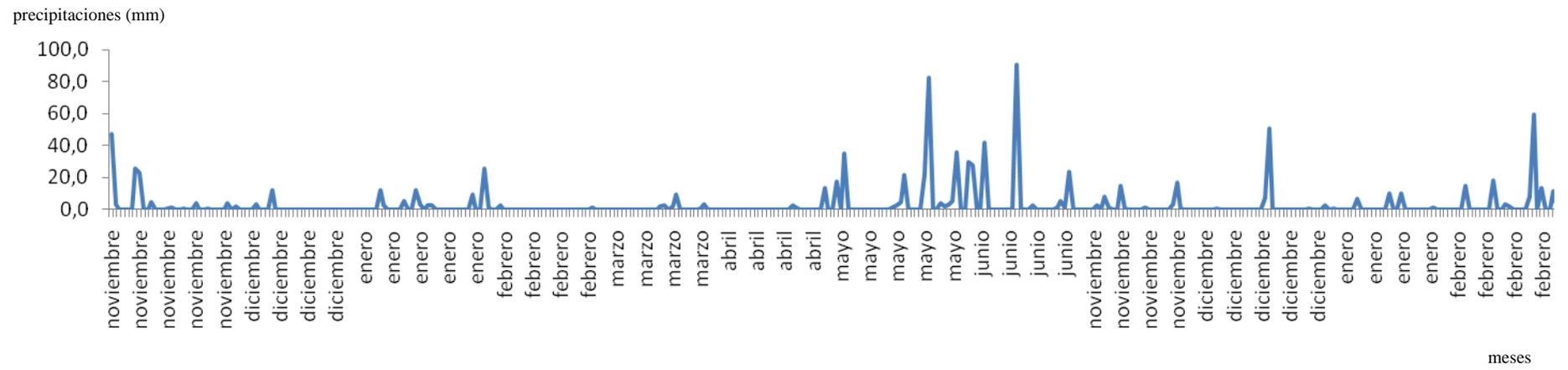
**ANEXOS**



b

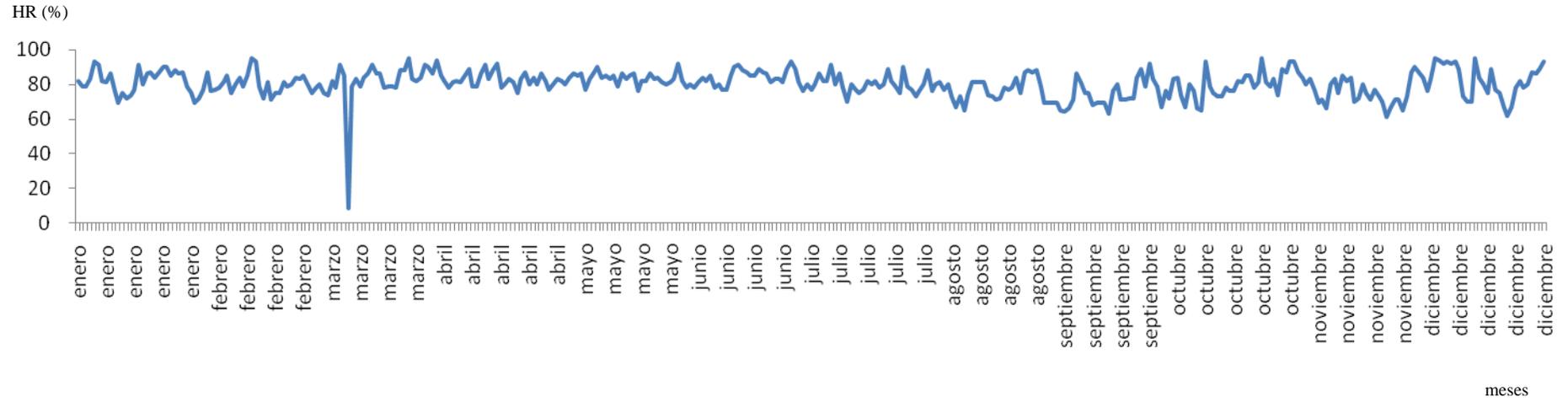


c





b



c

