

TRANSMISIÓN DE LOS BEGOMOVIRUS TYLCV Y ToVEV A GENOTIPOS COMERCIALES DE TOMATE MEDIANTE *Bemisia tabaci* (Gennadius) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)

Liseth Bastidas¹, Francis Geraud-Pouey², Dorys T. Chirinos²,
Gustavo Romay³ y María A. Santana⁴

RESUMEN

El complejo begomovirus-*Bemisia tabaci* (Gennadius) constituye el principal problema fitosanitario en el cultivo de tomate en Venezuela. Los genotipos resistentes a begomovirus son una alternativa en el manejo integrado de este problema. En consecuencia, se evaluó el comportamiento de los cultivares Río Grande (CRG), Alba, El Cid y Shan TY, el primero susceptible y los otros tres promocionados como resistentes a TYLCV. Este virus, junto al ToVEV, son dos begomovirus del tomate comunes en el país. La transmisión se hizo mediante *B. tabaci* y se midió el tiempo para aparición de síntomas y eficiencia de trasmisión. Con TYLCV, el CRG mostró síntomas a los $12,6 \pm 1,2$ días post-inoculación (DPI) en el 100 % de las plantas, mientras que en Alba, El Cid y Shan TY el tiempo de aparición varió de $14,1 \pm 1,3$ a $16 \pm 1,5$ DPI con una amplitud de 18,5 a 33,3 % de plantas sintomáticas, aunque en general con síntomas leves. Con ToVEV, en el CRG los síntomas aparecieron a los $12,4 \pm 1,2$ días con 100 % de plantas sintomáticas, para el resto de los cultivares más de la mitad de las plantas (amplitud de 66,7 a 81,5 %) mostraron síntomas en un tiempo que varió de $12 \pm 1,1$ a $14,9 \pm 1,4$ DPI. El Cid mostró los síntomas más severos. En todas las plantas expuestas a los begomovirus fue detectado ADN viral mediante PCR. La resistencia a un begomovirus puede proveer cierto grado de resistencia a otros, pero no a todos los begomovirus; no obstante, los que mostraron tolerancia podrían utilizarse para disminuir el efecto de estos begomovirus en el cultivo del tomate en Venezuela.

Palabras clave adicionales: Acciones comerciales, mosca blanca, susceptibilidad

ABSTRACT

Transmission of the begomoviruses TYLCV and ToVEV to tomato commercial genotypes by *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)

The begomovirus-*Bemisia tabaci* (Gennadius) complex is the main sanitary problem of tomatoes in Venezuela. Genotypes resistant to begomoviruses are a valuable alternative for integrated management of this problem. Consequently, it was assessed the performance of the cultivars Río Grande (CRG), Alba El cid and Shan TY, the first one susceptible and the other three promoted as resistant to TYLCV. This virus, along with ToVEV, are two common tomato begomoviruses in Venezuela. Transmission assays mediated by *B. tabaci* were conducted to assess time for symptoms appearance and transmission efficiency. CRG showed TYLCV symptoms after 12.6 ± 1.2 days post inoculation (DPI) in 100 % of the plants, while for the remaining cultivars it ranged from 14.1 ± 1.3 to 16 ± 1.5 DPI with 18.5-33.3 % of symptomatic plants, generally with mild symptoms. With ToVEV for CRG, symptoms appeared at 12.4 ± 1.2 DPI with 100 % of affected plants, and for the other cultivars more than half of the plants (ranging 66.7 to 81.5 %) showed symptoms at 12 ± 1.1 to 14.9 ± 1.4 DPI. El Cid showed the most severe symptoms. In all plants exposed to begomovirus, viral DNA was detected by PCR. The resistance to a begomovirus can provide some resistance to another but not to all of them. However, those that showed tolerance could be utilized to reduce the effect of these begomoviruses on tomato crops in Venezuela.

Additional key words: Commercial accessions, susceptibility, whitefly

Recibido: Marzo 27, 2015

Aceptado: Agosto 21, 2015

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Zulia), Maracaibo. e-mail: lisethbastidas@gmail.com

² Unidad Técnica Fitosanitaria, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Maracaibo.

e-mail: fgeraudp@gmail.com; dtchirinos@gmail.com

³ Instituto de Estudios Avanzados. Apdo. 17606. Caracas. e-mail: gromay@idea.gob.ve

⁴ Dpto. de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. e-mail: m.santana@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los begomovirus (familia Geminiviridae) son transmitidos de manera circulativa, no propagativa, exclusivamente por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Fereres y Moreno, 2009), los cuales, debido a su impacto económico en el mundo, han adquirido gran relevancia (Moriones y Navas, 2000; Nava et al., 2006; Massumi et al., 2009). En Venezuela, desde principios de los años noventa, estas afecciones virales se convirtieron en el más importante problema fitosanitario del cultivo del tomate (Faría y Nava, 2009; Romay et al., 2010; Chirinos et al., 2012). Antes de esa década el único begomovirus conocido era el “mosaico amarillento del tomate” descrito con base a su sintomatología por Debrot et al. (1963); sin embargo, desde entonces, nuevos begomovirus han sido detectados para varias zonas del país entre los que destacan los encontrados en los estados Aragua, Guárico y Monagas, uno de los cuales fue secuenciado parcialmente y denominado “Venezuela tomato geminivirus” por Guzmán et al. (1997) y posteriormente referido como ToVEV por Argüello Ruiz (2001).

Posteriormente, otros noveles begomovirus bipartitos fueron reportados en el país, entre estos, el *Tomato yellow margin leaf curl virus* (TYMLCV) (Nava et al., 2012), el *Tomato chlorotic leaf distortion virus* (ToCLDV) en el Zulia (Zambrano et al., 2011) y el *Euphorbia mosaic Venezuela virus* en Aragua (Zambrano et al., 2012). Así mismo, en el año 2007 fue reportado por primera vez para Venezuela y Sur América un begomovirus monopartito el “virus del encrespado amarillo de la hoja del tomate” (*Tomato yellow leaf curl virus*; TYLCV siglas en inglés) encontrado en sembradíos comerciales de este cultivo en varios estados del país (Zambrano et al., 2007). Todo esto sugiere una apreciable diversidad de begomovirus existentes en Venezuela. Morales (2006) señaló que en Latinoamérica se encuentra la mayor diversidad e incidencia de estas afecciones virales.

Las medidas de control para los begomovirus se han basado en la reducción de las poblaciones de *B. tabaci* mediante el uso de insecticidas (Chirinos y Geraud, 2011; Chirinos et al., 2011; Flores, 2015), protección de semilleros (Hilje et al., 2001; Hilje y Stansly, 2008; Chirinos et al.,

2014) y el uso de materiales genéticos resistentes (Moriones y Navas, 2000; Chirinos et al., 2012). Aun cuando el tomate es una especie originaria de Suramérica, el mejoramiento genético se ha llevado a cabo en zonas de clima templado (Morales y Anderson, 2001) y con especial énfasis en generar resistencia hacia el virus TYLCV (Lapidot et al., 1997) debido a las grandes pérdidas que ha causado en varias partes del mundo (Moriones y Nava, 2000; Gómez et al., 2004).

En Venezuela, además de la presencia del TYLCV, tienen mayor ocurrencia otros begomovirus bipartitos entre los que resalta el ToVEV (Güerere, 2013). Por esa razón es necesario evaluar la reacción de los genotipos comerciales de tomate ante la infección de begomovirus autóctonos como son los bipartitos y ante el introducido TYLCV, con genoma monopartito, para racionalizar los manejos de estas importantes enfermedades virales, especialmente en cuanto a la selección de genotipos resistentes a begomovirus. El objetivo de este trabajo fue evaluar la transmisión del TYLCV y el ToVEV mediante su vector natural, *Bemisia tabaci*, para estimar la velocidad de aparición de síntomas, porcentajes de infección y relaciones entre infección y aparición de síntomas, como indicadores de infecciones en genotipos de tomate, promovidos en el mercado como “resistentes a begomovirus”, a manera de alternativa para el manejo de estos problemas fitosanitarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue conducido en condiciones de laboratorio ($26,7 \pm 1,5$ °C y $75 \pm 3,7$ % HR) combinado con jaulas-umbráculos, en el exterior del laboratorio ($29,6 \pm 4,0$ °C y $87 \pm 4,5$ % HR), en la Unidad Técnica Fitosanitaria, Laboratorio de Manejo Integrado de Plagas en Frutales y Hortalizas (MIPFH), Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia. Los diagnósticos moleculares se realizaron en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar, Sartenejas, municipio Baruta, estado Miranda.

La colonia de *B. tabaci*, libre de virus, previamente determinada como del biotipo B (Geraud et al., 2009) ahora *B. tabaci* MEAM 1 (Romay et al., 2011) fue mantenida sobre plantas

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

Los begomovirus evaluados fueron el TYLCV Mild (Portugal) con genoma monopartito introducido desde Medio Oriente y el ToVEV con genoma bipartito como uno de los virus autóctonos de Venezuela. Ambos provenientes de plantas fuentes mantenidas en ambientes separados en los laboratorios de MIPFH. Dichos begomovirus fueron previamente identificados, como TYLCV y ToVEV de muestras obtenidas de las plantas fuentes de estos virus mantenidas en el laboratorio, las cuales fueron secuenciadas y depositadas en el banco de genes (GenBank), donde quedaron registradas con los números de accesión JX025074 y JX025075, respectivamente (Chirinos et al., 2012).

El origen y mantenimiento de las plantas infectadas (fuentes) con TYLCV fue referido por Geraud et al. (2009). Se trata de una colonia iniciada a partir de una planta de tomate colectada en el año 2004 al noroeste del estado Zulia. Éstas fueron mantenidas en jaulas entomológicas y en condiciones de iluminación ya descritas para las plantas de algodón.

En otro laboratorio, y con las mismas condiciones de jaulas ya descritas, se mantuvieron las plantas fuentes del virus ToVEV, el cual fue colectado en plantas ubicadas en la zona de Peribeca, estado Táchira, en julio de 2007 (Chirinos et al., 2012).

Se evaluaron cuatro genotipos de tomate: 1. Cultivar Río Grande (Petoseed Co., Saticoy, California,) incluido como control por su susceptibilidad a ambos virus. 2. Alba (variedad venezolana del INIA registrada en el Servicio Nacional de Semillas, Senasem) 3. El Cid (híbrido de Petoseed Co.). 4. Shan TY (código: 3371, híbrido de Hazera Genetics Seed, Berurim, Israel). Estos tres últimos genotipos son promocionados por su resistencia a TYLCV.

Las semillas de cada uno de los genotipos de tomate fueron sembradas en bandejas germinadoras de polietileno de 28 cm de ancho x 55 cm largo con 128 receptáculos sobre sustrato a base de turba y mantenidas en jaulas entomológicas dentro del laboratorio hasta el momento de la germinación.

Luego de la germinación, las bandejas fueron trasladadas hacia las jaulas tipo umbráculo (2,3 m de largo x 1,12 m de ancho x 1 m de alto), con estructura de perfiles de aluminio cerrada con malla anti-áfidos de 15 x 15 hilos-cm⁻², colocadas sobre mesones en el exterior del laboratorio. Estas bandejas fueron regadas diariamente y fertilizadas dos veces por semana a razón de 2 g por planta de la fórmula hidrosoluble 18-18-18.

Después de veinte días de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas a vasos plásticos desechables de 400 mL, cuyo sustrato consistió en una mezcla de suelo areno-francoso y materia orgánica vegetal (“abono de río”) en proporción 2:1, previamente esterilizada.

Cada planta cultivada en vaso plástico fue confinada en una jaula cilíndrica de plástico transparente (sección de envase de gaseosa de 2 L, de 10 x 15 cm, (diámetro x altura) con el tope cerrado con organza). Dentro de cada jaula se introdujo un vial del succionador de boca con 20 adultos de *B. tabaci*, emergidos durante las últimas 24 h y provenientes de la colonia libre de virus (plantas de algodón), o de una de las colonias sobre plantas fuentes de TYLCV o ToVEV. Los insectos fueron mantenidos durante 48 h como período de acceso para inoculación (PAI), después de lo cual fueron eliminados de las plantas, asperjando una suspensión del insecticida imidacloprid (Relevo 500) a 0,35 g·L⁻¹ i.a. Previo a la eliminación de los adultos con insecticida se colectaron 20 moscas para cada una de las tres

condiciones de transmisión (TYLCV, ToVEV y no virulíferas) por cada cultivar, reuniéndolas luego en muestras compuestas, conformadas por 80 individuos por condición de transmisión, provenientes de los cuatro cultivares juntos. Las moscas fueron preservadas en alcohol etílico 98 % a -20 °C para finalmente detectar la presencia de ADN viral en las mismas.

Las plantas fueron colocadas individualmente en macetas plásticas de 3 L de capacidad y pasadas a las jaulas umbráculos en el exterior del laboratorio para realizar las evaluaciones mediante observaciones diarias por un período de 30 días post-trasplante, caracterizando los síntomas y registrando el día de su aparición así como el porcentaje de plantas sintomáticas.

Con el objeto de confirmar la presencia de virus en plantas expuestas a moscas blancas virulíferas y no virulíferas a los 30 días post evaluación de aparición de síntomas se tomaron dos muestras de ápices foliares por tratamiento en cada repetición, en plantas sintomáticas y asintomáticas, cuando las hubo.

Asimismo, se tomaron muestras de ápices de las plantas fuentes de TYLCV y ToVEV para cotejar la presencia del virus en éstas con el detectado en las plantas a las que se le realizó la transmisión. Igualmente se tomaron muestras de las plantas de algodón donde fueron mantenidas las moscas libres de virus.

Se realizó la extracción del ADN de las muestras de ápices mediante el procedimiento de Gilbertson et al. (1991) mientras que para la extracción de ADN viral de adultos de *B. tabaci* se tomaron 20 hembras tanto virulíferas como no virulíferas, preservadas en alcohol etílico absoluto, para ser procesadas por separado siguiendo el protocolo de Frohlich et al. (1999).

Para la detección de ADN viral en las plantas y los adultos de *B. tabaci* se amplificó un fragmento de unos 550 pb correspondiente a la región central del gen que codifica la proteína de la cápside utilizando los cebadores degenerados AV494 y AC1048. La cantidad de ADN total usada en cada reacción fue de aproximadamente 1 µg, se usaron los cebadores AV494 y AC1048 de acuerdo a la metodología seguida por Wyatt y Brown (1996). Como control negativo se incluyeron plantas sanas de tomate cultivadas en condiciones de aislamiento y como controles positivos plantas

enfermas con TYLCV y ToVEV.

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

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 4 (dos virus más el testigo sin virus y cuatro genotipos de tomate) para un total de 12 tratamientos, tres repeticiones y nueve plantas por unidad experimental para un total de 324 plantas en el ensayo.

Los porcentajes de plantas sintomáticas fueron transformados con la función $\sqrt{(x+1)}$ con el fin de homogenizar las varianzas y ajustarlas a la distribución normal. En el caso de las variables día de aparición de síntomas y porcentaje de plantas sintomáticas, el análisis de la varianza fue realizado con el modelo lineal general (GLM) y las comparaciones de media con las pruebas de mínimos cuadrados utilizando el programa estadístico SAS 6.0 (Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de begomovirus en muestras de plantas y adultos de *B. tabaci*. La detección del virus por PCR utilizando el par de iniciadores AV494-AC1048 resultó ser positiva para las muestras de plantas de tomate fuentes de TYLCV y de ToVEV, observándose el fragmento de tamaño esperado de 550 pb, mientras que las muestras tomadas de plantas de algodón usadas como testigo, en las cuales se mantuvo la colonia de moscas blancas no virulíferas, no mostraron dichas bandas, lo que demuestra que no estaban infectadas con begomovirus (Figura 1). Adicionalmente, la amplificación mediante PCR utilizando los mismos iniciadores también permitió la detección de ADN viral en las moscas virulíferas que fueron utilizadas en los ensayos de transmisión para ambos begomovirus, resultado que contrastó con lo observado para aquellas

moscas alimentadas sobre algodón (testigo) donde no se detectó ADN viral (Figura 2).

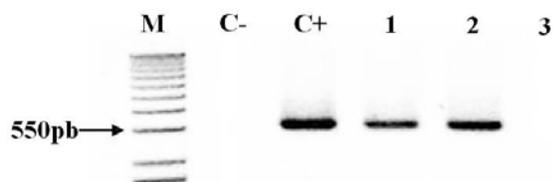


Figura 1. Detección de ADN viral en las plantas fuentes de los virus y plantas de algodón. M: marcador molecular; C-: control negativo; C+: control positivo; 1: planta fuente de TYLCV; 2: planta fuente de ToVEV; 3: planta de algodón

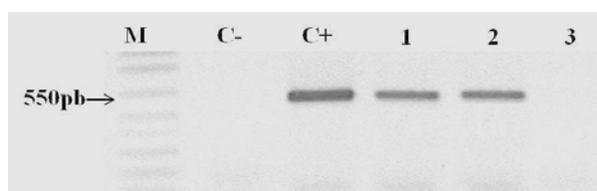


Figura 2. Detección de ADN viral en *B. tabaci*. M: marcador molecular; C-: control negativo; C+: control positivo; 1: adultos de *B. tabaci* alimentados sobre plantas con TYLCV; 2: adultos de *B. tabaci* alimentados sobre plantas con ToVEV; 3: adultos de *B. tabaci* alimentados sobre plantas de algodón.

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

En contraste, cuando los mismos cultivares de tomate fueron infectados con ToVEV en aquellos mejorados para resistir a TYLCV hubo una mayor proporción de plantas que manifestaron síntomas. Así, en Alba, El Cid y Shan TY, aunque los

porcentajes de plantas sintomáticas resultaron inferiores comparados con Río Grande, más de la mitad de las plantas mostraron síntomas (amplitud; 66,7- 81,5 %, $P \leq 0,05$). No obstante, aunado al hecho que los síntomas de ToVEV se manifestaron con mucho más rapidez en Río Grande comparado con el resto de los cultivares evaluados, denota un cierto grado de resistencia de los mismos a este virus.

Con relación al porcentaje acumulado de síntomas en el tiempo, se encontró que para el caso de TYLCV (Figura 3A) las primeras plantas sintomáticas fueron detectadas en Río Grande a los 9 días después del PAI, mientras que en los otros cultivares esto ocurrió entre los 12 y 13 días. En estos cultivares existía menos del 20 % de plantas sintomáticas, cuando el Río Grande ya había alcanzado el 70 %, para luego llegar al 100 % de plantas sintomáticas a los 15 días posterior al PAI. Los tiempos promedio de aparición de síntomas son consistentes con estas diferencias ($P \leq 0,05$; Cuadro 2). La variedad Río Grande se infectó en el menor tiempo promedio (12 días), comparado con el resto, siendo Shan TY en la que más se retardó la infección promedio (16 días; Cuadro 2) en las pocas plantas que los manifestaron (10 %; Figura 3A).

Cuadro 1. Porcentaje (media \pm SD) de plantas con síntomas de TYLCV y ToVEV transmitidos por *B. tabaci* en cuatro cultivares de tomate

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

Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de mínimos cuadrados ($P \leq 0,05$); n: número de plantas evaluadas

Cuadro 2. Tiempo transcurrido (media ± SD) para la aparición de síntomas de TYLCV y ToVEV transmitidos por *B. tabaci* en cuatro cultivares de tomate

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

Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de mínimos cuadrados ($P \leq 0,05$); n: número de plantas evaluadas

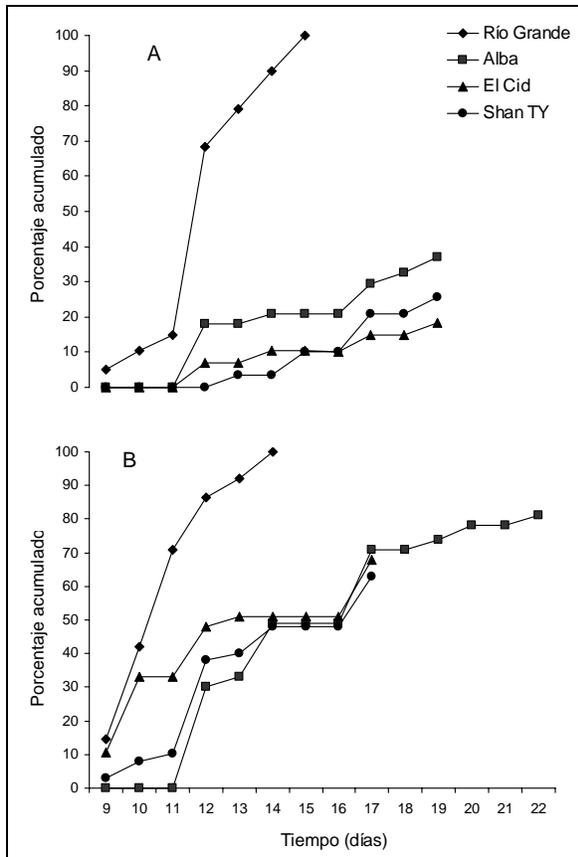


Figura 3. Porcentajes de síntomas de TYLCV y ToVEV acumulados en el tiempo para los cuatro cultivares de tomate después de la exposición a adultos virulíferos de *B. tabaci*

Con variantes, similar fue la tendencia seguida por estos cultivares cuando fueron infectados con ToVEV (Figura 3B). Para el cultivar Río Grande, cerca del 50 % de las plantas estaban infectadas a los 10 días, comparado con los otros cultivares, donde aproximadamente la mitad de las plantas se infectaron a los 14 días, tiempo en el cual todas las plantas de la variedad Río Grande mostraron síntomas de la infección. El tiempo promedio de aparición de síntomas con este begomovirus no mostró mayor diferencia entre genotipos, con excepción de Río Grande, donde resultó inferior en comparación con Alba, en el cual resultó significativamente superior.

Aunque no todas las plantas de los genotipos resistentes mostraron síntomas de la enfermedad, bien sea TYLCV o ToVEV, en las muestras de plantas, tanto sintomáticas como asintomáticas, se detectó ADN viral cuando fueron analizadas a través de la PCR (Figura 4). Estos resultados confirman la presencia de ADN viral en las plantas que resultaron sintomáticas y convierte en hospederos asintomáticos a aquellos que aunque no manifestaron síntomas de la enfermedad, contenían begomovirus. Si bien esto denota resistencia a los begomovirus evaluados, plantea el riesgo de llevar al campo plantas asintomáticas portadoras de virus, potenciales fuentes para su transmisión mediante el insecto vector, especialmente si las condiciones de protección física para la propagación son inadecuadas como para evitar el acceso de los vectores a esos semilleros (Chirinos et al., 2014).

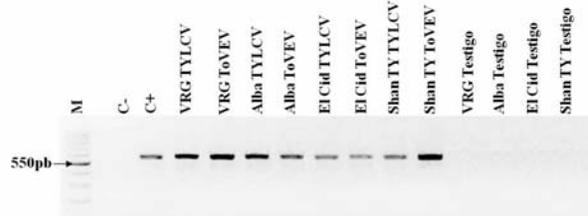


Figura 4. Detección de ADN viral en cuatro cultivares de tomate. M: marcador molecular; C-: control negativo; C+: control positivo; VRG: variedad Río Grande. La flecha indica el fragmento de 550 pb

Caracterización de síntomas de TYLCV y ToVEV en los genotipos de tomate.

TYLCV. Los síntomas de este begomovirus en la

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

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

La mayor rapidez en la aparición de síntomas de ambos begomovirus en la variedad Río Grande detectada coincide con lo previamente señalado en anteriores trabajos tanto para TYLCV (Chirinos et al., 2009; Geraud et al., 2009) como para ToVEV (Romay et al., 2010; Fernández et al., 2011; Chirinos et al., 2012). Así mismo, el bajo porcentaje de plantas sintomáticas y el retardo en la aparición de síntomas en Alba, El Cid y Shan TY ante TYLCV era de esperarse debido a que estos genotipos han sido mejorados para resistir la infección por este begomovirus monopartito.

El Alba merece especial atención dado que es un genotipo promocionado en Venezuela como parte de las alternativas para disminuir los problemas fitosanitarios causados por begomovirus. Este genotipo manifestó síntomas leves de TYLCV en parte de las plantas evaluadas y ante la infección del ToVEV los síntomas fueron leves y tendieron a atenuarse hacia el final del

ensayo, lo que sugiere silenciamiento génico, como producto de la degradación del ARN viral producido en el proceso de replicación del virus (Cortés y López, 2011). Esto podría ser una medida de resistencia de un begomovirus mejorado para TYLCV ante uno autóctono como es el ToVEV. Sin embargo, otros estudios de laboratorio y campo deben ser realizados para promover su uso en la disminución de los problemas causados por estas enfermedades virales.

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

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

A pesar de que la fuente de resistencia de begomovirus en tomate está dirigida principalmente hacia el monopartito TYLCV, también se han realizado evaluaciones de comportamiento en líneas de tomates resistentes a TYLCV ante el *Tomato chlorotic mottle* (begomovirus bipartito) obteniéndose resultados promisorios (Giordano et al., 2005). Dada la importancia del begomovirus bipartito PYMV en la América Latina se han realizado trabajos de mejoras genéticas de tomate ante este virus (Boissot et al., 2008).

La importancia de evaluar cultivares resistentes a TYLCV ante otros begomovirus es que hasta ahora en Venezuela no se han realizado mejoramientos genéticos de cultivares de tomate para resistir a begomovirus autóctonos. Así, mientras se realizan investigaciones para generar genotipos resistentes a begomovirus nativos,

deben seguirse evaluando los resistentes ante otras especies de estos virus para así descartar aquellos que muestren susceptibilidad ante los begomovirus autóctonos y continuar evaluando aquellos que muestren resistencia a los mismos y que puedan resultar promisorios para el manejo de este importante problema fitosanitario.

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

Esta respuesta diferencial se explica en parte por el hecho que los begomovirus monopartitos presentan características genéticas diferentes a los bipartitos (Fauquet et al., 2008). Por otro lado, en este trabajo se encontraron diferencias en cuanto a manifestación de síntomas y porcentajes de infección entre los cultivares resistentes al TYLCV ante el ToVEV. Un ejemplo de ello, la severidad de los síntomas observada en las plantas El Cid, comparadas con Alba y Shan TY. Estas diferencias podrían estar asociadas a los genes que han sido mejorados para resistir a un begomovirus en particular y no necesariamente funcionan para otros begomovirus (Gilbertson et al., 2011).

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

CONCLUSIONES

Los híbridos Alba, El Cid y Shan TY promocionados como resistentes al begomovirus TYLCV mostraron síntomas ante el ToVEV en más de la mitad de las plantas evaluadas, los mismos resultaron más severos en El Cid.

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

AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT), por haber subvencionado parte de esta investigación a través del Proyecto G-2000001610 y a la Red Cyted N° 111RT0433.

LITERATURA CITADA

1. Argüello-Astorga y G. Ruiz-Medrano, R. 2001. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch. Virol.* 146: 1465-1485.
2. Boissot, N., C. Urbino, J. Dintinger y C. Pavis. 2008. Vector and graft inoculations of *Potato yellow mosaic virus* reveal recessive resistance in *Solanum pimpinellifolium*. *Ann. Appl. Biol.* 152: 263-269.
3. Chirinos, D.T., P. Güerere, F. Geraud-Pouey, G. Romay, M. A. Santana y L. Bastidas. 2009. Transmisión experimental de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) por *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) a algunas solanáceas en Venezuela. *Rev. Colomb. Entomol.* 35: 22-27.
4. Chirinos, D.T y F. Geraud-Pouey. 2011. El manejo de plagas agrícolas en Venezuela. Análisis y reflexiones sobre algunos casos. *Interciencia* 36: 192-199.
5. Chirinos, D.T., M. Paradiso, R. Dávila y F. Geraud-Pouey. 2011. Efecto del imidacloprid sobre la transmisión de un begomovirus por *Bemisia tabaci* en tomate. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 28: 73-82.
6. Chirinos, D.T, F. Geraud-Pouey, G. Romay, P. Güerere, M.A. Franco e I. Galindo-Castro. 2012. Evaluación de genotipos comerciales de tomate por su resistencia a begomovirus. *Interciencia* 37: 451-456.
7. Chirinos, D.T., F. Geraud-Pouey, G. Romay, C. Fernández, L. Bastidas, L. Flores y P. Güerere. 2014. Infección por begomovirus en plantas de tomate propagadas bajo diferentes condiciones de protección física de semilleros. *Bioagro* 26: 57-62.
8. Cortés, S. y C. López. 2011. Gene silencing and applications for functional gene validation.

- The case of geminivirus. Agron. Colomb. 29: 27-34.
9. Czosnek, H., A. Kheyr-Pour, B. Gronenborn, E. Remetz, M. Zeidan, A. Altman, H. Rabinowitch, S. Vidavsky, N. Kedar, Y. Gafni y D. Zamir. 1993. Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) DNA in agroinoculated leaf discs from selected tomato genotypes. Plant. Mol. Biol. 22: 995-1005.
 10. Debrot, E, F. Herold y F, Dao. 1963. Notas preliminares sobre un mosaico amarillento del tomate en Venezuela. Agronomía Tropical 13: 33-41.
 11. Fariá, A. y A. Nava. 2009. Detección por PCR de Begomovirus en el cultivo del tomate en las áreas productoras de Los Andes venezolanos. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 26: 179-195.
 12. Fauquet, C.M., R.W. Briddon, J.K. Brown, E. Moriones, J. Stanley, M. Zerbini y X. Zhou. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Arch. Virol. 153:783–821.
 13. Fereres, A. y A. Moreno. 2009. Behaviour aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. Virus Res. 141: 158-168.
 14. Fernández, C., J. Chirinos, J. Mejías, A. Gómez, F. Geraud-Pouey, D.T. Chirinos y G. Romay. 2011. Crecimiento de cuatro accesiones de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) infectados con el virus del tomate de Venezuela (ToVEV). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 28: 291-300.
 15. Flores, L., F. Geraud-Pouey, D. T. Chirinos y L. Melendez-Ramirez. 2015. Efectividad de algunos insecticidas para el control de *Bemisia tabaci* (Gennadius) en tomate, *Solanum lycopersicum* L. Interciencia 40: 121-126.
 16. Frohlich, D., I. Torres-Jerez, P. Bedford y J.K. Brown. 1999. A phylogeographic analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. Mol. Ecol. 8: 1593-1602.
 17. Geraud, F., D.T. Chirinos, G. Romay, M.A. Santana, L. Bastidas y L. Flores. 2009. Transmisión del TYLCV a diferentes materiales de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) mediado por el Biotipo B del complejo *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Venezuela. Bioagro 21: 23-31.
 18. Gilberston, R.L., M.R. Rojas, D.R. Rusell y D.P. Maxwell. 1991. Use of asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of Bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. J. Gen. Virol. 72: 2843-2849.
 19. Gilberston, R.L., M. Rojas y E. Natwick. 2011. Development of Integrated Pest Management (IPM) Strategies for Whitefly (*Bemisia tabaci*) –Transmissible Geminiviruses. In: Winston Thompson (ed.). The Whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-infected Hosts Plants. Springer Netherlands. Dordrecht. pp. 323-356.
 20. Giordano, L.B., V. L. Silva-Lobo, F. Santana, M. Fonseca y L.S. Boiteux. 2005. Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon esculentum* cv. ‘Tyking’. Euphytica 143: 27-33.
 21. Gómez, O., M. Piñón, Y. Martínez, M. Quiñonez, D. Fonseca y H. Laterrot. 2004. Breeding for resistance to Begomovirus in tropic-adapted tomato genotypes. Plant. Breed. 123: 275-279.
 22. Güerere, P.R. 2013. Evaluación de la transmisión del *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-MId) en hospederas alternas cultivadas y silvestres mediante el biotipo B de mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) (Hemiptera: Aleyrodidae). Tesis. Convenio Universidad del Zulia. Universidad de Córdoba. 134 p.
 23. Guzmán, P., C. Arredondo, D. Emmatty, R. Portillo y R. Gilbertson. 1997. Partial characterization of two whitefly-transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. Plant. Dis. 81: 312.
 24. Hilje, L., H. Costa y P. Stansly. 2001. Cultural practices for managing *Bemisia tabaci* and associated viral diseases. Crop Protection 20: 801–812.
 25. Hilje, L. y P. Stansly. 2008. Living ground covers for management of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) and *tomato yellow mottle virus* (ToYMoV) in Costa Rica. Crop Protection 27: 10-16.
 26. Lapidot, M., M. Friedmann, O. Lachman, A. Yehezkel, S. Nahon, S. Cohen y M. Pilowsky.

1997. Comparison of resistance level to *Tomato yellow leaf curl virus* among commercial cultivars and breeding lines. *Plant. Dis.* 81: 1425-1428.
27. Massumi, H., M. Shaabani, A. Hosseini, J. Heydarnejad y H. Rahimian. 2009. Incidence of virus infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant. Dis.* 93: 67-72.
28. Morales, F. 2006. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Adv. Virus. Res.* 67: 127-155.
29. Morales, F.J. y P.K. Anderson. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.* 146: 415-441.
30. Moriones, E. y J. Navas-Castillo. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res.* 71: 123-134.
31. Nava, A.R., C.P. Patte, E. Hiebert y J.E. Polston. 2006. Detection and variability of begomoviruses in tomato from the Andean States of Venezuela. *Plant. Dis.* 90: 61-66.
32. Nava, A., A. Londoño y J. E. Polston. 2012. Characterization and distribution of *tomato yellow margin leaf curl virus*, a begomovirus from Venezuela. *Arch. Virol.* 158: 399-406.
33. Romay, G., F. Geraud-Pouey, D.T. Chirinos, F. Morales, E. Herrera, C. Fernández y A.K. Martínez. 2010. Transmisión del virus Venezuela tomato geminivirus por *Bemisia tabaci* (Gennadius), Hemiptera: Aleyrodidae, en Maracaibo, Venezuela. *Neotrop. Entomol.* 39: 266-74.
34. Romay, G., F. Geraud-Pouey, D.T. Chirinos, M.A. Santana, I. Galindo-Castro y L.M. Márquez. 2011. Microsatellites reveal widespread predominance of an invasive over an indigenous *Bemisia tabaci* in Venezuela. *Phytoparasitica* 39: 419-428.
35. Wyatt, S.D. y J.K. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathol.* 86:1288-1293.
36. Zambrano, K., O. Carballo, F. Geraud, D.T. Chirinos, C. Fernández y E. Marys. 2007. First Report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Venezuela. *Plant. Dis.* 91: 768.
37. Zambrano, K., F. Geraud-Pouey, D. Chirinos, G. Romay y E. Marys. 2011. *Tomato chlorotic leaf distortion virus*, a new bipartite begomovirus infecting *Solanum Lycopersicum* and *Capsicum chinense* en Venezuela. *Arch. Virol.* 156: 2263-2266.
38. Zambrano, K., T. Fernández-Rodríguez y E. Marys. 2012. Molecular characterization of new begomovirus that infects *Euphorbia heterophylla* and *Solanum lycopersicum* in Venezuela. *Arch. Virol.* 157: 379-382.