



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD: E. T. S. DE INGENIERIA AGRONÓMICA Y DE MONTES

CONVENIO: UNIVERSIDAD DEL ZULIA – UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

Evaluación de la transmisión del *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Mld) en hospederas alternas cultivadas y silvestres mediante el biotipo B de mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) (*Hemiptera: Aleyrodidae*)

Doctorando:

Ing. Agr. Pascual Güerere Pereira MSc.

Directores:

Dra. Dorys T. Chirinos

LUZ, Venezuela

Dr. Enrique Moriones A.

IHSM-UMA-CSIC, España

Dr. Francis Geraud P.

LUZ, Venezuela

Maracaibo, Venezuela – Mayo de 2013

TÍTULO: *Evaluación de la transmisión del Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-Mld) en hospederas alternas cultivadas y silvestres mediante el biotipo B de mosca blanca (Bemisia tabaci (Gennadius)) (Hemiptera: Aleyrodidae)*

AUTOR: *PASCUAL RAMON GÜERERE PEREIRA*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Evaluación de la transmisión del *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Mld) en hospederas alternas cultivadas y silvestres mediante el biotipo B de mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) (*Hemiptera: Aleyrodidae*)

**Autor:
Pascual Güerere Pereira**

**Tesis presentada como parte de los requerimientos para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Córdoba**

**Programa de Doctorado en Biotecnología Agraria
Línea de Microbiología Agrícola
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y Montes
Departamento de Microbiología
Universidad de Córdoba**

2013



TÍTULO DE LA TESIS:

Evaluación de la transmisión del *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Mld) en hospederas alternas cultivadas y silvestres mediante el biotipo B de mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) (*Hemiptera: Aleyrodidae*)

Evaluation of the transmission of the *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Mld) in cultivated and wild host using the B biotype whitefly (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) (*Hemiptera: Aleyrodidae*)

DOCTORANDO/A: Pascual Ramón Güerere Pereira

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

En diciembre de 2006, Pascual Güerere Pereira se incorporó a las actividades de investigación en Moscas Blancas del complejo *Bemisia tabaci* y Geminivirus desarrolladas en el Laboratorio de Manejo Integrado de Plagas en Frutales y Hortalizas, Unidad Técnica Fitosanitaria, Facultad de Agronomía, La Universidad del Zulia (LUZ), para realizar sus investigaciones como requisito del Postgrado de Biotecnología Agrícola (Programa de Doctorado en Ingeniería de Plantas Agroindustriales), en el convenio Universidad de Córdoba-LUZ, los cuales fueron realizados para optar por el Diploma de Estudios Avanzados (DEA).

En ese momento sus investigaciones estuvieron orientadas al estudio de solanáceas silvestres y cultivadas como potenciales hospederas del TYLCV-Mld transmitidas a las mismas mediante *B. tabaci* en condiciones de laboratorio. Esta investigación fue culminada y presentada en el año 2008. Esto generó dentro del grupo de investigación su primera contribución a congresos (2007) y posteriormente su primera de publicación (2009).

Todo este trabajo se realizó dentro del proyecto No. G-2000001610 titulado “Grupo Nacional de Investigación sobre moscas blancas del complejo *Bemisia tabaci* (Gennadius) y otros insectos vectores de enfermedades virales en tomate y otros cultivos. I. *B. tabaci* y geminivirus”, subvencionado por el Fondo de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT) adscrito al Ministerio de Ciencia y Tecnología de Venezuela y coordinado por el Dr. Francis Geraud Pouey.

Siguiendo con sus investigaciones, posteriormente Pascual Güerere Pereira trabajó en cuatro (4) áreas de investigación que finalmente conformaron su tesis Doctoral: 1. Análisis molecular de un inventario nacional hecho para detectar begomovirus en tomate en Venezuela. 2. Dos ensayos de transmisión de dos begomovirus a varios genotipos comerciales de tomate. Uno de éstos valió una contribución a congreso (año 2009) y su segunda publicación dentro del equipo de trabajo (año 2012). 3. Transmisión experimental a varias especies de plantas. Vale destacar que en este trabajo se reportó por primera vez a la especie *Amaranthus dubius* como potencial hospedera del TYLCV-Mld, lo que significó su tercera publicación. Finalmente, el cuarto trabajo versó sobre la evaluación de la evolución de una infección por Begomovirus en campo, trabajo que en este momento se encuentra en arbitraje.

En el año 2011, Pascual Güerere Pereira pasa a formar parte del proyecto de Red Temática No. 111RT0433 titulada “Red Iberoamericana de manejo integrado de enfermedades virales en hortícolas” financiado por la Fundación CYTED cuya coordinación general está a cargo del Dr. Enrique Moriones Alonso y como Coordinadora por Venezuela la Dra. Dorys T. Chirinos.

En conjunto, en la tesis se han abordado tanto aspectos aplicados como aspectos básicos que han permitido una formación integral del doctorando y suponen un notable avance en el conocimiento sobre la problemática de los begomovirus en Venezuela y aspectos necesarios para la toma de decisiones para su control. Esta información es muy valiosa para el establecimiento de estrategias de control más duraderas y robustas.

A continuación se listan los productos (publicaciones y contribuciones a congresos) generados de los trabajos de investigación de tesis doctoral y avalamos el cumplimiento de los objetivos para ser defendida como tesis doctoral.

PUBLICACIONES

CHIRINOS DT, **GUERERE P**, GERAUD-POUEY F., ROMAY G., SANTANA MA, BASTIDAS L. 2009. Transmisión experimental de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) por *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) a algunas solanáceas en Venezuela. Revista Colombiana de Entomología. 35 (1): 22-27.

CHIRINOS DT, GERAUD-POUEY F., ROMAY G, **GUERERE P**, FRANCO MA, GALINDO-CASTRO I. 2012. Evaluación de genotipos comerciales de tomate por su resistencia a Begomovirus. Interciencia. 36(6): 451-456. ISSN 0378-1844 12/06/2012

GÜERERE P, CHIRINOS DT, GERAUD-POUEY F, MORIONES E, SANTANA MA, FRANCO MA, GALINDO-CASTRO I, ROMAY G. 2012. Experimental transmission of the mild strain of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) to *Amaranthus dubius* by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Phytoparasitica. 40(4): 369-373.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

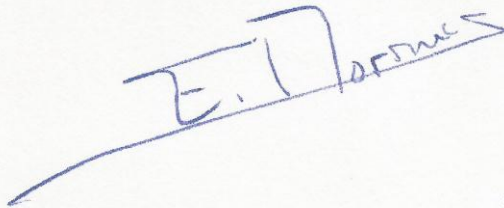
GUERERE-PEREIRA P., GERAUD-POUEY F., CHIRINOS D.T., ROMAY G., SANTANA M.A, BASTIDAS L. CHACÍN L. 2007. Evaluación de Solanáceas como Hospederas Alternas del Virus del Encrespado Amarillento de la Hoja del Tomate (TYLCV), transmitido por *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). XX Congreso Venezolano de Entomología. San Cristóbal, Táchira, Venezuela. 22-26 julio. En resúmenes. p. 185-186.

CHIRINOS D.T, VASQUEZ M, GERAUD-POUEY F., GALINDO I, FRANCO MA, ROMAY G. **GUERERE-PEREIRA P.** 2009. Transmisión de dos *Begomovirus* por *Bemisia tabaci* a algunos materiales de tomate, *Solanum lycopersicum* L. XXI Congreso Venezolano de Entomología. Caracas, Venezuela. 19-23 julio. En resúmenes.

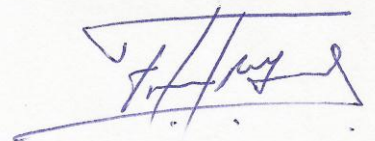
GÜERERE-PEREIRA P., GERAUD-POUEY F., CHIRINOS D.T., ROMAY G, GALINDO I, FRANCO MA, VASQUEZ M. 2009. Trasmisión experimental del Tomato Yellow Mosaic Virus por *Bemisia tabaci* (Gennadius) a especies de plantas. XXI Congreso Venezolano de Entomología. Caracas, Venezuela. 19-23 julio. En resúmenes.



Dorys T. Chirinos



Enrique Moriones Alonso



Francis Geraud Pouey

DEDICATORIA

A la memoria de mi Padre, Pedro Güerere Piña, mi mejor maestro.

A mi querida Madre, Carmen Pereira de Güerere y a mis grandes amores: mi esposa Nevis Pirela de Güerere, mi hija Andreina Beatriz Güerere Pirela y mis nietos: Oriana Valentina y José Antonio Piña Güerere, quienes siempre me han apoyado en todos mis proyectos de vida.

A mis hermanas, hermanos, sobrinos, demás familiares y amigos.

A los productores del campo y a todo aquel que ame la agricultura...

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi mayor agradecimiento a los doctores: Dorys T. Chirinos, Francis Geraud-Pouey y Enrique Moriones Alonso, quienes fungieron como directores de esta Tesis Doctoral y dieron su apoyo irrestricto en todas las fases de realización de la misma.

También deseo manifestar mi gratitud a la doctora María Angélica Santana por su valiosa colaboración en la ejecución de los análisis moleculares.

Al Ing. Agr. Gustavo Romay MSc., quien reafirmó la premisa “...el alumno enseña a su antiguo maestro...”

Un agradecimiento especial a mis colegas María Vásquez, Liseth Bastidas y Laer Flores, quienes desinteresadamente contribuyeron en el desarrollo de los diferentes experimentos de campo llevados a cabo para este estudio. Asimismo, al Dr. Iván Galindo y María Alejandra Franco en el Instituto de Estudios Avanzados, por su valioso apoyo.

Finalmente, doy gracias a las siguientes instituciones por permitir la planificación y desarrollo de este trabajo de tesis:

Laboratorio de Manejo Integrado de Plagas en Frutales y Hortalizas de la Unidad Técnica Fitosanitaria, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Laboratorio de Genómica y Proteómica, Centro de Biotecnología del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Venezuela.

Departamento de Biología Celular, División de Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, municipio Baruta, estado Miranda, Venezuela.

Herbario de La Universidad del Zulia “Omar Zambrano” (HERZU), Facultad de agronomía, por su orientación en la identificación de algunas especies de planta utilizadas en el desarrollo de este estudio.

Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por el cofinanciamiento de este estudio a través del proyecto G-2000001610, al Convenio Cuba-Venezuela, por la subvención “Estudio y caracterización de la variabilidad genética de plagas emergentes en los ecosistemas agrícolas”

Instituto Universitario de Tecnología de Maracaibo, mi sitio de trabajo y cofinancista de mi curso de doctorado.

Fundación para la Ciencia y Tecnología, capítulo Zulia (FUNDACITE-ZULIA)

A Dios y a todos muchas gracias...

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
INDICE DE CONTENIDO.....	ix
INDICE DE CUADROS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xvii
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xx
INTRODUCCION GENERAL	1
OBJETIVOS	4
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	6
1.1 Importancia de los virus fitopatogénicos.....	6
1.2 Transmisión de enfermedades virales de plantas	6
1.3 Taxonomía de virus.....	10
1.4 La Familia Geminiviridae	11
1.5 Organización del genoma de los Begomovirus	14
1.6 Importancia de Begomovirus como causantes de enfermedades de plantas.....	16
1.7 <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV), origen y su entrada a América.....	17
1.8 Transmisión de Begomovirus mediante <i>Bemisia tabaci</i>	19
1.9 Síntomas inducidos por Begomovirus	20
1.10 <i>Bemisia tabaci</i> Gennadius.....	21
1.11 Colonias de <i>Bemisia tabaci</i> libres de virus y plantas fuentes de TYLCV y ToVEV en la Unidad Técnica Fitosanitaria (UTF), La Universidad del Zulia (LUZ).....	24
1.11.1 Para TYLCV	24
1.11.2 Para ToVEV.....	26
1.12 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27

CAPÍTULO II. INVENTARIO DE BEGOMOVIRUS EN TOMATE EN VENEZUELA.....	30
2.1 Introducción.....	30
2.2 Materiales y métodos	31
2.2.1 Colección de muestras de hojas.....	31
2.2.2 Extracción de ADN y detección de begomovirus por PCR	33
2.3 Resultados y discusión.....	37
2.3.1 Análisis de comparación de secuencias parciales y virus relacionados	38
CAPÍTULO III. TRANSMISIÓN EXPERIMENTAL DE TYLCV-MLD MEDIANTE <i>Bemisia tabaci</i> A PLANTAS DE CRECIMIENTO ESPONTANEO Y CULTIVADAS COMO POSIBLES HOSPEDERAS ALTERNAS DEL VIRUS	45
3.1 Introducción.....	45
3.2. Materiales y métodos	48
3.2.1 Área y condiciones de estudio.....	48
3.2.2 Plantas evaluadas	48
3.2.3 Procedimiento experimental de la transmisión	51
3.2.4 Retransmisión.....	54
3.2.5 Toma de muestras de tejidos vegetales y del vector.....	54
3.2.6 Extracción de ADN vegetal y en <i>Bemisia tabaci</i>	55
3.2.7 Detección de begomovirus por PCR	56
3.2.8 Análisis estadísticos	57
3.3 Resultados y discusión.....	57
3.3.1 Detección de TYLCV en plantas fuentes del virus y en moscas blancas usadas en los ensayos de transmisión	57
3.3.2 Especies susceptibles y aparición de síntomas.....	59
3.3.3 Identidad del Begomovirus	65
3.3.4 Síntomas observados.....	65
3.3.5. Retransmisión de TYLCV a <i>Solanum lycopersicum</i>	70
3.3.6 El caso particular de <i>Amaranthus dubius</i>	74
3.3.7 Consideraciones finales	75

CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN DE GENOTIPOS COMERCIALES DE TOMATE ANTE SU RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS	77
4.1 Introducción.....	77
4.2 Materiales y métodos	81
4.2.1. Genotipos comerciales evaluados.....	81
4.2.2 Producción de plantas experimentales.....	82
4.2.3 Ensayo de transmisión	82
4.2.4 Extracción de ADN y detección de begomovirus por PCR.	84
4.2.5 Análisis estadísticos	84
4.3. Resultados y discusión.....	84
4.3.1 Ensayo 1.....	84
4.3.2 Ensayo 2.....	87
CAPÍTULO V. EVALUACIÓN EXPERIMENTAL EN CAMPO DE LAS INFECCIONES POR TYLCV EN PLANTAS DE TOMATE PROPAGADAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE PROTECCIÓN DE SEMILLEROS.....	95
5.1 Introducción.....	95
5.2 Materiales y métodos	96
5.2.1 Área y condiciones de estudio.....	96
5.2.2 Tratamientos.....	96
5.2.3 Procedimiento experimental	97
5.2.4 Analisis moleculares.....	97
5.2.5 Analisis estadísticos	98
5.3 Resultados y discusión.....	98
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	105
INDICE DE REFERENCIAS.....	106
ANEXOS	116

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales familias de insectos vectores de virus de plantas (Orden <i>Hemiptera</i>), nombres comunes de las principales especies descritas, especies vectores y virus transmitidos.....	8
Cuadro 2. Regiones de Venezuela donde se colectaron muestras para el inventario de begomovirus.....	32
Cuadro 3. Número de accesiones del GenBank y acrónimos de las secuencias del ADN-A de los begomovirus bipartitos disponibles en las bases de datos de acceso público y empleados en las comparaciones realizadas en este estudio.....	36
Cuadro 4. Número de accesiones del GenBank y acrónimos de las secuencias de los begomovirus monopartitos incluidas en este estudio de comparación de ADN y análisis filogenéticos	37
Cuadro 5. Begomovirus relacionados con los descritos respecto al fragmento amplificado así como la identidad de la secuencia nucleótida (NSI) para las muestras de las diferentes regiones de Venezuela. Periodo 2000-2009	40
Cuadro 6. Presencia de TYLCV-Mild en el total de muestras de tomate analizadas con infección simple. Período 2000-2009	42
Cuadro 7. Porcentaje de plantas con síntomas de TYLCV como resultado de la transmisión por <i>Bemisia tabaci</i> a plantas de cada especie evaluada expuestas por separado a individuos virulíferos y no virulíferos (testigos).	63
Cuadro 8. Promedio del tiempo de aparición en días de los síntomas de TYLCV, para especies de plantas expuestas a adultos virulíferos de <i>B. tabaci</i>	64

Cuadro 9. Porcentaje de plantas de tomate con síntomas de inoculadas mediante <i>B. tabaci</i> , a partir de plantas sintomáticas de <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>S. pimpinellifolium</i> y <i>Amaranthus dubius</i> . ^a	70
Cuadro 10. Promedio del tiempo de aparición (días) de síntomas en plantas de tomate inoculadas con adultos de <i>Bemisia tabaci</i> que adquirieron durante 48 horas el virus en especies de plantas que presentaron síntomas.	71
Cuadro 11. Promedio general del porcentaje de plantas con síntomas de begomovirus en los diferentes genotipos comerciales de tomate evaluados, durante 30 días después de la inoculación. Período octubre – diciembre 2008.	85
Cuadro 12. Promedio general del día de aparición de síntomas de los begomovirus transmitidos a los diferentes genotipos comerciales de tomate evaluados. Período octubre – diciembre 2008.	86
Cuadro 13. Promedio general del porcentaje de plantas con síntomas de begomovirus en los diferentes genotipos comerciales de tomate evaluados. Período mayo – junio 2009.	88
Cuadro 14. Promedio general del día de aparición de síntomas de los begomovirus transmitidos a los diferentes genotipos comerciales de tomate evaluados. Período mayo – junio 2009.	91
Cuadro 15. Promedio del número de ninfas de <i>B. tabaci</i> por hoja de 70 cm ² de área foliar promedio ^a	101

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reconstrucción microscópica de electrones Cryo (izquierda) del virus del rayado del maíz (MSV).....	12
Figura 2. Organización del genoma de un begomovirus bipartito.....	14
Figura 3. Organización del genoma de un begomovirus monopartito.....	16
Figura 4. Adulto de <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	22
Figura 5. Regiones de Venezuela donde se colectaron muestras para el inventario de begomovirus.....	33
Figura 6. Presencia de TYLCV en diferentes estados de Venezuela	43
Figura 7. Especies de plantas evaluadas: a. <i>Datura stramonium</i> , b. <i>Amaranthus dubius</i> , c. <i>Sida aggregata</i> , d. <i>Merremia aegyptia</i>	49
Figura 8. Especies de plantas evaluadas: a. <i>Euphorbia hirta</i> , b. <i>Cleome spinosa</i> , c. <i>Solanum pimpinellifolium</i> , d. <i>Solanum americanum</i> , e. <i>Capsicum annum</i> , y f. <i>Solanum lycopersicum</i>	50
Figura 9. Mapa indicando la ciudad de Maracaibo, estado Zulia	51
Figura 10. Diagnostico por PCR de la presencia de ADN viral en: 1. Plantas de tomate fuentes de TYLCV y 2. Plantas de algodón, utilizadas para los ensayos de transmisión mediante <i>B. tabaci</i>	58

Figura 11. Detección mediante PCR de TYLCV en adultos de <i>Bemisia tabaci</i> mantenidos sobre las plantas tomate fuente del virus y sobre plantas de algodón.....	59
Figura 12. Especies de plantas evaluadas. A. <i>Solanum lycopersicon</i> y B. <i>Datura stramonium</i> , expuestas a 1. Adultos de <i>Bemisia tabaci</i> no virulíferos y 2. Adultos de <i>B. tabaci</i> virulíferos	60
Figura 13. Especies de plantas evaluadas. A. <i>Solanum pimpinellifolium</i> y B. <i>Amaranthus dubius</i> , expuestas a 1. Adultos de <i>Bemisia tabaci</i> no virulíferos y 2. Adultos de <i>B. tabaci</i> virulíferos.....	61
Figura 14. Detección mediante PCR de TYLCV en las diferentes especies de plantas experimentales.....	62
Figura 15. Síntomas asociados con transmisión de TYLCV, observados en plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> durante la evaluación.	66
Figura 16. Síntomas asociados con transmisión de TYLCV, observados en plantas de <i>Datura stramonium</i> durante la evaluación.....	67
Figura 17. Síntomas asociados con transmisión de TYLCV, observados en plantas de <i>Solanum pimpinellifolium</i> durante la evaluación.....	68
Figura 18. Síntomas asociados con transmisión de TYLCV, observados en plantas de <i>Amaranthus dibius</i> durante la evaluación.....	69
Figura 19. Detección mediante PCR de <i>Begomovirus</i> detectadas en plantas de tomate retransmitidas a partir de 1 y 2 <i>Solanum lycopersicum</i> ; 3 y 4 <i>S. pimpinelifolium</i> ; 5 y 6 <i>Datura stramonium</i> ; 7 y 8 <i>Amaranthus dubius</i>	71

Figura 20. Determinación de estados replicativos del TYLCV en plantas de <i>Amaranthus dubius</i> utilizando sondas de hibridación específicas mediante prueba de Southern blot.	76
Figura 21. Detección de begomovirus en las plantas de los diferentes cultivares de tomate, <i>Solanum lycopersicum</i> L., que fueron inoculadas mediante <i>Bemisia tabaci</i> virulíferas y no virulíferas. Cultivar Río Grande; Tomate Helena y Tomate Cecile. 1 al 3: expuestas a moscas blancas sin virus; al TYLCV; y al ToVEV	85
Figura 22. Plantas de los tres cultivares de tomate, <i>Solanum lycopersicum</i> L., En las columnas aparecen los cultivares y en las filas los diferentes tratamientos inoculados mediante <i>Bemisia tabaci</i> con TYLCV, ToVEV y sin virus.....	87
Figura 23. Plantas de los diferentes cultivares de tomate, <i>Solanum lycopersicum</i> L., inoculados mediante <i>Bemisia tabaci</i>	90
Figura 24. Detección mediante PCR de ToVEV y TYLCV en muestras de plantas de diferentes genotipos comerciales de tomate.	92
Figura 25. Porcentaje acumulado de plantas sintomáticas según el tratamiento.	99
Figura 26. Detección mediante PCR de begomovirus en muestras de plantas tomate del ensayo de campo. 1. Planta de semilleros protegidos, 2. Planta de semilleros protegidos con algunas plantas infectadas con TYLCV, 3. Planta de semilleros expuestos mantenidos en la Unidad Técnica Fitosanitaria (UTF), 4. Planta de semilleros expuestos mantenidos en finca y 5. Planta de semilleros provenientes de un vivero comercial.....	100

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Muestras del inventario de begomovirus. Período: 2000 - 2009.....	119
Anexo 2. Especies de begomovirus asociadas con Tomato yellow leaf curl disease..	125
Anexo 3. Mapa político de Venezuela	1299
Anexo 4. Mapa político del estado Zulia, Venezuela.	1299
Anexo 5. Diagrama del movimiento circulativo – no propagativo del begomovirus en <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	130
Anexo 6. Mantenimiento de colonias de <i>Bemisia tabaci</i> virulíferas en plantas de tomate.	130
Anexo 7. Inoculación de las plántulas con TYLCV mediante <i>Bemisia tabaci</i>	131
Anexo 8. Plantas inoculadas con TYLCV, trasplantadas a macetas y colocadas en jaulas-umbraculo.	131
Anexo 9. Jaulas-umbraculo fabricadas con estructura de aluminio y malla anti-áfido, suspendidas en mesones de hierro.....	132
Anexo 10. Frasco para desecar las muestras y tubo para almacenarlas una vez desecadas.....	132
Anexo 11. Abreviaturas y su significado	133

Pascual Güerere Pereira. **Evaluación de la transmisión del *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Mld) en hospederas alternas cultivadas y silvestres mediante el biotipo B de mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) (Hemiptera: Aleyrodidae).** Tesis para optar al título de Doctor en Biotecnología Agrícola a través del Doctorado conjunto Universidad del Zulia – Universidad de Córdoba.

RESUMEN

Durante marzo 2008 - noviembre 2009, se realizaron cuatro trabajos de investigación, el primero consistió en los análisis moleculares de muestras de tomate colectadas entre los años 2000 y 2009 provenientes de un inventario nacional de begomovirus. La extracción de ADN viral se hizo utilizando el protocolo de Gilbertson *et al.* (1991); para la amplificación del ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron los siguientes pares de cebadores: AV494 - AC1048, PAL1v1978 - PAR1c715 y KL04-06CPF - KL04-07CPR. Las secuencias de nucleótidos de los productos de PCR fueron identificadas por electroforesis capilar, y analizadas por el programa DNAMAN (versión 5.0) y comparadas con la base de datos de genes del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI) mediante el programa BLAST 2.0. En el segundo trabajo se realizaron ensayos de transmisión experimental de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Mld) mediante *Bemisia tabaci* a especies de plantas de crecimiento espontáneo y una solanácea cultivada para evaluarlas como hospederas de dicho virus. Se expusieron individualmente a adultos virulíferos de *B. tabaci*, especies de plantas comunes en Venezuela: *Amaranthaceae*: *Amaranthus dubius*; *Capparidaceae*: *Cleome spinosa*, *Malvaceae*: *Sida aggregata* Presl., *Merremia aegyptia* (L), *Euphorbiaceae*: *Euphorbia hirta*; *Solanaceae*: *Solanum americanum*; *S. pimpinellifolium*, *Datura stramonium* y las cultivadas, *Capsicum annuum* y *S. lycopersicum*. Esta última fue utilizado como control susceptible a TYLCV. Para el control negativo se utilizaron plantas de las mismas especies, expuestas a adultos de *B. tabaci* criados sobre plantas de algodón sin begomovirus. Se hicieron observaciones diarias para detectar síntomas hasta 30 días post-período de exposición al vector tanto en aquellas plantas infectadas con moscas virulíferas como en aquellas inoculadas con moscas libres de virus. En aquellas especies donde se detectó el virus, se realizó la retransmisión hacia tomate. Se tomaron muestras de ápices foliares para determinar la presencia de virus. En el tercer estudio se realizaron dos ensayos para evaluar el comportamiento ante dos begomovirus (TYLCV-Mld y un begomovirus bipartito relacionado con el Tomato Venezuela Virus (ToVEV)), de genotipos de tomate mejorados para resistir a TYLCV. En el primer ensayo se utilizaron las variedades Hazera: Helena (HA-3228) y Cecile (HA-3229), el cultivar Río Grande fue el testigo susceptible. En el segundo se evaluaron: variedad Río Grande (VRG), híbrido Río Grande (HRG), híbrido Río Orinoco (HRO), variedad Cherry (VCh), El Cid, Shirley (HA-3331), ShanTY (HA-3371) y Tres (HA-3359), los cuatro últimos mejorados para resistir a TYLCV. Finalmente, se realizó un ensayo de campo para aproximar cómo evoluciona una epifitía de begomovirus en una siembra de tomate con plantas provenientes de semilleros con y sin protección.

Tratamientos: 1. Semilleros protegidos (SP); 2. SP con algunas plantas infectadas con TYLCV-Mld, 3. Semilleros sin protección (SSP) en la Unidad Técnica Fitosanitaria (UTF), 4. SPP en una finca y 5. SPP en una empresa comercial. Las semillas utilizadas fueron HRG, los cuatro primeros sembrados en la UTF y el último fue sembrado en la empresa. Las infecciones, observaciones, toma de muestras y análisis moleculares se realizaron siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente.

Para las variables: tiempo de aparición de síntomas y porcentaje de plantas sintomáticas, se aplicaron los supuestos de normalidad. El tiempo de aparición de síntomas y el análisis de la varianza fue hecho con el Modelo Lineal General (GLM), las comparaciones de media con el método de los Mínimos Cuadrados (LSMEANS).

Según los resultados de las secuencias parciales del inventario nacional, el 44,8% de las infecciones por begomovirus están relacionadas con *Potato yellow mosaic virus* (PYMV), seguido de 14,5; 11 y 10,3% relacionadas con ToVEV, *Merremia mosaic virus* y TYLCV, respectivamente. El 4,8 % mostraron similitud con *Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus* (ToMYLCAV), el 2,8 % con *Tomato yellow margin leaf curl virus* (TYMLCV) y el 1,4 % con *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus* (RhGMYuV). Quince de las 145 secuencias parciales hechas (10,3 %) mostraron baja relación con las secuencias de begomovirus reportadas en el GenBank ya que los porcentajes de identidad para el fragmento fueron inferiores al 89%. En el segundo estudio se observaron síntomas de infección viral (amplitud 9,3 – 12,3 días) en *S. lycopersicum*, *D. stramonium*, *S. pimpinellifolium* y *A. dubius*, lo cual fue corroborado por PCR infectándose entre el 63 y 100% de las plantas evaluadas. En la retransmisión hacia tomate se consiguieron infecciones a partir de todas las especies evaluadas. Se demostró que *A. dubius* es un hésped potencial de TYLCV-Mld. Respecto a la tercera evaluación, en el primer ensayo los genotipos de Hazera que resultaron asintomáticos para el TYLCV-Mld mostraron síntomas ante el begomovirus bipartito (56,7 y 66,7% de las plantas). El ADN viral fue detectado en todas las plantas evaluadas. En el segundo ensayo, todos los genotipos evaluados mostraron síntomas de ambos begomovirus, resultando más susceptibles, VRG, HRG, HRO, Cherry y El Cid respecto a los genotipos de Hazera. En el trabajo de la epifitía en campo, todas las plantas mostraron síntomas al final del ensayo. Las infecciones evolucionaron con mayor rapidez en aquellas provenientes del vivero comercial. Los resultados muestran que en Venezuela los virus bipartitos son de mayor ocurrencia que TYLCV. Las secuencias parciales arrojaron mayor porcentaje de muestras con virus relacionados con PYMV. Se reporta por primera vez a *A. dubius* como hospedero experimental de TYLCV-Mld. Dada la importancia de los virus bipartitos en Venezuela, mientras se generan genotipos comerciales de tomate resistentes a éstos, es necesario evaluar aquellos mejorados para otros virus, ya que algunos muestran cierta resistencia ante los bipartitos. El uso de prácticas como la protección de semilleros podrían resultar alternativas para disminuir el impacto de estas enfermedades virales.

Palabras clave: reservorio, plaga, afecciones virales, cultivares resistentes

Correo electrónico: pguerere@cantv.net – pguerere@gmail.com

Pascual Güerere Pereira. **Evaluation of transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Mld) in wild and cultivated alternate host by biotype B of whitefly (*Bemisia tabaci*) (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae).** Thesis for Ph.D. in Agricultural Biotechnology through Universidad del Zulia and Universidad de Córdoba agreement.

ABSTRACT

During March 2008 - November 2009, four research works were carried out, the first consisted of molecular analysis of tomato samples collected between the years 2000 and 2009 from a national inventory of begomovirus. Viral DNA extraction was done using the protocol of Gilbertson *et al.* (1991); the following pairs of primers were used for amplification of DNA by the polymerase chain reaction: AV494 - AC1048, PAL1v1978 - PAR1c715 and KL04-06CPF - KL04-07CPR. Sequences of nucleotides of the PCR products were identified by capillary electrophoresis and analyzed using the program DNAMAN (version 5.0) and compared with nucleotide sequences available in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLAST 2.0 program. In the second work, trials of experimental transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Mld) by *Bemisia tabaci* to spontaneously growing plants species and a cultivated species were conducted to evaluate them as host of the virus. Plants were individually exposed to adult viruliferous of *B. tabaci*. Species evaluated were common plants in Venezuela: weeds such as *Amaranthaceae: Amaranthus dubius*; *Capparidaceae: Cleome spinosa*, *Malvaceae: Sida aggregata* Presl., *Merremia aegyptia* (L), *Euphorbiaceae: Euphorbia hirta*; *Solanaceae: Solanum americanum*; *S. pimpinellifolium*, *Datura stramonium* and cultivated plants such as *Capsicum annuum* and *S. lycopersicum*. This latter was used as control of susceptible species to TYLCV. Plants of the same species, exposed to adults of *B. tabaci* reared on cotton plants without begomovirus were used as negative control. Daily observations were made to detect symptoms up to 30 days post-exposure period to the vector. In those species where the virus was detected, transmission experiments to tomato were conducted. Leaf apices were sampled for analysis of the presence of viruses. In the third study two trials were conducted to evaluate the behavior to two begomoviruses (TYLCV-Mld and a bipartite begomovirus related Tomato Venezuela Virus (ToVEV)), of tomato genotypes improved to TYLCV resistance. Hazera varieties were used in first trial: Helena (HA-3228) and Cecile (HA-3229), the cultivar Rio Grande was the susceptible control. In second trial cultivars assessed were: variety Rio Grande (VRG), hybrid Rio Grande (HRG), hybrid Rio Orinoco (HRO), variety Cherry (VCh), El Cid, Shirly (HA-3331), ShanTY (HA-3371) and Tres (HA-3359), the last four improved for resistance to TYLCV. Finally, a field trial was conducted to evaluate the evolution of an epidemic of begomovirus in a crop of tomato from seedlings with and without protection. Treatments: 1. protected seedling production (SP); 2. SP with some plants infected with TYLCV-Mld, 3. Seedling production without protection (SSP) in the plant technical unit (UTF), 4. SPP in a farm and 5. SPP in a trading company. The seeds used were HRG, the first four seedlings treatments were planted in the UTF and the last in the company. Infections,

observations, sampling and molecular analyses were carried out using the procedure mentioned above.

According to the results, 44.8% of the begomovirus infections are related with *Potato yellow mosaic virus* (PYMV), followed by 14.5; 11 and 10.3% related to ToVEV, *Merremia mosaic virus* and TYLCV, respectively. Also, 4.8% of the begomovirus-infected samples exhibited similarity with *Tomato yellow leaf curl Aragua mild virus* (ToMYLCAV), 2.8% with *Tomato yellow leaf curl virus margin* (TYMLCV) and 1.4% with *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus* (RhGMYuV). Fifteen of the 145 partial sequences obtained (10.3%) showed limited relationship with any of the begomoviruses reported in GenBank since the percentages of identity for the sequenced fragment were less than 89%. In the second study, we observed symptoms of TYLCV-Mld infection (amplitude 9.3-12.3 days) in *S. lycopersicum*, *D. stramonium*, *S. pimpinellifolium* and *A. dubius*, and infections were confirmed by PCR in 63 to 100% of the test plants. It was demonstrated that *A. dubius* is a potential alternative host of TYLCV-Mld. Regarding the third study, TYLCV-tolerant genotypes were asymptomatic for TYLCV-Mld but showed symptoms to the bipartite begomovirus ToVEV (56.7 and 66.7% of the plants). Viral DNA was detected in all the evaluated plants. In the disease progress field study, all plants exhibited symptoms of begomovirus infection at the end of the trial. The virus present in symptomatic plants was TYLCV-Mld. Infections evolved faster in those plants coming from the commercial seedling. In summary, the results showed that in Venezuela that New World bipartite begomoviruses predominate in nature and *A. dubius* is reported for the first time as host of TYLCV-Mld. Given the importance of the bipartite begomoviruses in Venezuela, it will be necessary to evaluate resistance to these viruses in commercial genotypes since some showed some tolerance to these viruses. The use of practices such as the protection of seedlings might be an alternative to reduce the the impact of these viral diseases.

Key words: reservoirs, begomovirus genetic diversity, viral conditions, resistant cultivars
Email: pquerere@cantv.net - pquerere@gmail.com

INTRODUCCION GENERAL

El tomate, *Solanum lycopersicum* L. es una de las hortalizas más consumidas en todo el mundo en una diversidad de formas que van desde el consumo fresco hasta los preparados y procesados. Aunque es originario de Suramérica, en la actualidad forma parte de las dietas y los platos tradicionales de gran cantidad de culturas en todo el mundo, e igual de cosmopolita es su producción, siendo China el primer productor mundial, con un promedio de 20 millones de toneladas por año seguido por EE.UU. y la Unión Europea, para alcanzar, junto a otros países, una producción mundial de más de 100 millones de toneladas para el año 2002 (USDA, 2009). En Venezuela, en el 2007, la producción fue de doscientas siete mil toneladas, en una superficie aproximada de 9575 ha para abastecer el mercado nacional de tomate fresco y para la industria (MAT, 2007).

La producción de este cultivo en Venezuela, durante muchos años ha sido limitada por problemas fitosanitarios, entre éstos, los artrópodos plaga (Geraud-Pouey *et al.*, 1995; Chirinos *et al.*, 2009) y las enfermedades virales (Debrot *et al.*, 1963; Lastra y Uzcátegui, 1975; Faria y Nava; 2009; Nava *et al.*, 1996; 2006; 2012). Entre los insectos que afectan el cultivo de tomate en Venezuela, la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: *Aleyrodidae*), es probablemente la especie de mayor importancia, no solo por su efecto directo al alimentarse de los fotosintetizados, sino además por los virus que le puede transmitir, en especial los del género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*) (Chirinos *et al.*, 2009; Chirinos y Geraud-Pouey, 2011). Los begomovirus, consisten en cadenas simples de ADN, de forma circular, los cuales están empacados dentro de partículas icosaédricas gemelas (Paprotka *et al.*, 2010) y afectan el crecimiento de la planta llegando a causar en campos cultivados grandes epifitias (Polston y Anderson, 1997; 1999; Morales y Anderson, 2001; Morales, 2006,).

En Venezuela, el primer registro de un begomovirus transmitido por *B. tabaci* corresponde a Debrot *et al.* (1963), quienes lo mencionaron como “Mosaico amarillento

del tomate”, el cual fue posteriormente denominado *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV) (Morales *et al.*, 2001). En esa época este virus adquirió gran importancia debido a que limitaba el desarrollo y rendimiento de este cultivo (Lastra y Uzcátegui, 1975) causando problemas en los estados Lara, Aragua (Debrot *et al.*, 1963; Lastra y Uzcátegui, 1978), Guárico y Carabobo (Morales *et al.*, 2001). Aunque, con base a su sintomatología, fue originalmente descrito sobre tomate (Debrot *et al.*, 1963), la secuencia completa de su genoma fue determinada en Inglaterra a partir de muestras de papa, *Solanum tuberosum* L. infestadas con el virus, enviadas desde Venezuela, quedando reportado como *Potato yellow mosaic virus* (PYMV) (Roberts *et al.*, 1986; Coutts *et al.*, 1991). Esto generó una controversia taxonómica (Morales *et al.*, 2001; Morales, 2006) la cual sigue siendo discutida (Morales, 2006; Chirinos *et al.*, 2009; Geraud *et al.*, 2009; Romay *et al.*, 2010; Nava *et al.*, 2012).

En concordancia con lo que ocurría en otras regiones del Mundo como consecuencia de la dispersión de *B. tabaci*, en Venezuela, desde finales de los años ochenta, las enfermedades virales transmitidas por este insecto comenzaron a adquirir mucha relevancia en el cultivo del tomate (Geraud-Pouey *et al.*, 1995; Nava *et al.*, 2006; 2012; Chirinos *et al.*, 2009; Faria y Nava 2009; Romay *et al.*, 2010). Desde entonces, nuevos begomovirus han sido detectados para varias zonas del país, entre éstas, destacan los encontrados en los estados: Aragua, Guárico, Monagas (Guzmán *et al.*, 1997), así como, el *Tomato yellow margin leaf curl virus*, observado en la región andina (Nava *et al.*, 2006), cuyos números de accesoión en el Gen Bank (banco de genes) son AY508993 y AY508994 correspondientes a las secuencias nucleotídicas completas de los componentes A y B del genoma de un aislado del mencionado virus. En el año 2007, fue reportado por primera vez en Venezuela y para Suramérica, el virus del encrespado amarillo de la hoja del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV-Mld), en plantaciones comerciales de este cultivo en varios estados del país (Zambrano *et al.*, 2007). Esto supuso la primera cita de la presencia de un begomovirus monopartito en Suramérica. La enfermedad causada por este virus, Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD), es una de las afecciones virales más devastadoras en el cultivo del tomate, que causa pérdidas significativas en muchas regiones tropicales, subtropicales y

templadas (Accotto *et al.*, 2000). Esta enfermedad fue identificada en Israel durante 1960 (Cohen y Nitzany, 1966). Adicionalmente, dos nuevos Begomovirus bipartitos fueron detectados, *Tomato chlorotic leaf distortion virus* (ToCLDV) también en el Zulia (Zambrano *et al.*, 2011) y *Euphorbia mosaic Venezuela virus* en Aragua (Zambrano *et al.*, 2012). Lo antes expuesto pone en evidencia la diversidad de begomovirus en Venezuela. En este orden de ideas, Morales (2006) señaló que en Latinoamérica se encuentra la mayor diversidad e incidencia de estas afecciones virales.

Por estas razones, para algunas especies de begomovirus presentes en el país, se ha estudiado la eficiencia de su transmisión mediante *B. tabaci* (Romay *et al.*, 2010), la interferencia de insecticidas con la transmisión (Chirinos *et al.*, 2011), se ha determinado la susceptibilidad de algunos cultivares comerciales de tomate (Geraud *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2011; Chirinos *et al.*, 2012;) y se ha evaluado experimentalmente el potencial de algunas solanáceas como hospederas del TYLCV-Mld (Chirinos *et al.*, 2009; Güerere *et al.*, 2012).

De los inventarios realizados se puede obtener información sobre los begomovirus de mayor ocurrencia en el país, y conocer su distribución con el fin de acometer estrategias de control para limitar el posible impacto que estas enfermedades virales pueden tener sobre el cultivo del tomate.

Otro de los aspectos a considerar, es el referido a las hospederas silvestres que podrían constituir reservorios tanto asintomáticos y sintomáticos de estas afecciones virales. *Bemisia tabaci* coloniza a más de 500 especies de plantas en 74 familias botánicas (Greathead, 1986) y trasmite unas 114 especies de begomovirus (Jones, 2003). Algunos estudios han demostrado que los begomovirus que infectan al tomate y otros cultivos de importancia económica pueden infectar de igual manera a plantas de crecimiento espontáneo encontradas frecuentemente en las áreas de producción de interés agrícola (Sánchez-Campos *et al.*, 2000; Kashina *et al.*, 2002; Salati *et al.*, 2002; García-Andrés *et al.*, 2006; Papayiannis *et al.*, 2011), así como a otras especies

cultivadas pertenecientes a otras familias botánicas (Navas-Castillo *et al.*, 1999), que en Venezuela se rotan o siembran asociadas con el cultivo del tomate.

Es por ello que además de la evaluación del comportamiento de genotipos comerciales de tomate ante Begomovirus, tanto monopartitos como bipartitos, es importante tener conocimiento acerca de la amplitud de sus hospederas. Esto aporta información referida a la etiología de estas enfermedades, así como, de los aspectos epifitóticos y el papel que las hospederas alternas, tales como plantas silvestres y cultivadas, podrían jugar dentro del proceso epidemiológico de la enfermedad.

Por tales razones, esta tesis doctoral tuvo como fin, analizar un inventario nacional de Begomovirus, la evaluación experimental de algunas plantas silvestres y de una solanacea cultivada así como de genotipos comerciales de tomate ante la transmisión de Begomovirus; asimismo la evaluación en campo de la evolución de una epifiticia, los cuales constituyen las bases para aproximar las alternativas de manejo de estas afecciones virales en Venezuela. Dentro de este contexto, se presentan a continuación el objetivo general y los específicos que tuvo esta investigación.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar un inventario nacional de Begomovirus y evaluar experimentalmente la transmisión de dos de éstos en algunas plantas silvestres, en genotipos comerciales de tomate y la evolución de una epifiticia causada por dichos virus.

Objetivos Específicos

- A partir de un inventario nacional hecho entre los años 2000 y 2009, realizar secuencias parciales de Begomovirus para estimar con que virus están

relacionados y para aquellos que se aproximaran a TYLCV aplicar los cebadores específicos con fines de determinar la importancia de este último Begomovirus en Venezuela

- Evaluar la transmisión y retransmisión del TYLCV-Mld en algunas plantas de crecimiento espontaneo y una solanácea cultivada para determinar si podrían representar hospederas alternas sintomáticas o asintomáticas de este Begomovirus.
- Evaluar la transmisión del TYLCV-Mld y de un Begomovirus bipartito a varios genotipos comerciales de tomate para determinar su posible empleo como una alternativa de manejo de estas afecciones virales.
- Para plantas que resultasen susceptibles, estimar la velocidad en el desarrollo de síntomas así como la proporción de infección.
- Caracterizar los síntomas producidos en cada una de las especies de plantas evaluadas.
- Evaluar el desarrollo en campo de una epifitía de TYLCV en plantas con diferentes orígenes de propagación.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Importancia de los virus fitopatogénicos

Los virus de plantas pueden limitar sensiblemente la producción de aquellas especies cultivadas para la obtención de alimentos y fibras. Aunque hay importantes epifitias ocurridas en el mundo a finales del siglo XIX y principios del siglo XX que hoy son reconocidas por tener etiología de origen geminiviral, no fue sino hasta 1974 cuando se logró purificar y observar las partículas virales asociadas con estas enfermedades (Stanley *et al.*, 2001). Cinco años después, fue secuenciado y analizado el primer geminivirus, correspondiente al género begomovirus y aislado de yuca, *Manihot esculenta* Crantz (*African cassava mosaic virus*,) con lo cual se dio inicio a la nueva etapa de estudios basados en técnicas de biología molecular (Stanley, 1995).

1.2 Transmisión de enfermedades virales de plantas

Los virus mayormente son parásitos obligados y para sobrevivir, deben diseminarse hacia especies de plantas que le sirvan de huéspedes. El conocimiento de la forma cómo los virus se diseminan de una planta a otra es importante y la información sobre alguno de los siguientes aspectos puede ser esencial:

- Desde el punto de vista experimental, se puede reconocer una enfermedad en particular, sí se puede transmitir por algunos medios a plantas sanas y dicha enfermedad se reproduce.
- Los virus se consideran de importancia económica, sí pueden diseminarse de una planta a otra muy rápidamente ocasionando daños durante el ciclo comercial del cultivo.
- El conocimiento de las formas de mantenimiento y diseminación de un virus en el campo, usualmente es esencial para desarrollar medidas de control satisfactorias.

- Las interacciones entre el virus y sus vectores son de interés, tanto para la investigación científico-técnica como para desarrollar nuevos métodos en el control de los mismos.
- Ciertos métodos de transmisión, particularmente el mecánico, son muy importantes para el estudio de los virus en laboratorio.

En este orden de ideas, Brown y Czosnek (2006) señalan que la habilidad de los virus de dispersarse de un huésped a otro, es parte esencial de su ciclo de infección, razón por la cual, los virus de plantas han desarrollado un conjunto de medios especializados para garantizar su transmisión y consecuentemente, su supervivencia. Señalan los mismos investigadores que entre esos medios, se pueden mencionar la transmisión por polen y semilla. No obstante, el medio más común de transmisión incluye a vectores biológicos que se alimentan y completan su ciclo de vida en plantas que son huéspedes del virus. Entre los insectos que transmiten virus de plantas, aquellos que han desarrollado la habilidad de alimentarse de los tejidos vasculares de las superiores, son algunos de los vectores más comunes y dispersos de virus de plantas tanto en ecosistemas templados como en tropicales (Brown y Czosnek, 2006), sin embargo, es importante resaltar que los virus transmitidos por pulgones de forma no persistente, como los potyvirus, son de enorme importancia en todo el mundo y son adquiridos por alimentación en células superficiales de la epidermis o mesófilo (Lupoli *et al.*, 1992).

De los 29 órdenes que conforman la clase *Insecta*, sólo nueve poseen miembros que se alimentan de plantas vivas y que podrían ser posibles vectores, dichos órdenes se mencionan a continuación y se cita entre paréntesis el número aproximado de especies vectores: *Collembola* (0), *Orthoptera* (27), *Dermaptera* (1), *Coleoptera* (61), *Lepidoptera* (4), *Diptera* (2), *Hymenoptera* (0), *Thysanoptera* (10) y *Hemiptera* (*Heteroptera*: 4; *Homoptera*: 282) (Gray y Banerjee, 1999). Los insectos de los primeros siete órdenes son vectores mecánicos de virus debido a su aparato bucal tipo masticador, mientras que, *Thysanoptera* contiene insectos picadores-chupadores vectores para un importante grupo de virus de plantas y *Sternorrhyncha* es el suborden

más importante por el número de vectores de virus de planta, los cuales se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Principales familias de insectos vectores de virus de plantas (Orden *Hemiptera*), nombres comunes de las principales especies descritas, especies vectores y virus transmitidos.

Familia	Nombre común	Especies descritas (aproximado)	Especies vectores	Virus que transmite
Suborden				
<i>Auchenorrhyncha</i>				
<i>Cicadidae</i>	Chicharras	3.200	0	0
<i>Membracidae</i>	Carapachitos	4.500	1	1
<i>Cercopidae</i>	Salivitas	3.600	0	0
<i>Cicadellidae</i>	Saltahojas	15.000	49	31
<i>Fulgoridae</i>	Machacas	19.000	28	24
Suborden				
<i>Sternorrhyncha</i>				
<i>Psyllidae</i>	Chicharritas	2.000	0	0
<i>Aleyrodidae</i>	Moscas blancas	1.200	3	43
<i>Aphididae</i>	Áfidos	4.000	192	275
<i>Pseudococcidae</i>	Escamas	6.000	19	10

Fuente: Gray y Banerjee, 1999

Señalan los mismos autores que en la relación entre los virus de plantas y sus vectores, básicamente se conocen tres tipos fundamentales de transmisión: **no persistente**, cuando el virus es retenido por el vector durante pocas horas; y **semipersistente**, aquellos virus que pueden ser retenidos por el vector por varios días y posiblemente por semanas; en ambos casos, los virus son adquiridos e inoculados en periodos de tiempo que van de segundos a minutos; en ambos casos, no requieren un período de latencia desde su adquisición ni se replican dentro del vector. Existe también la transmisión de tipo **persistente**, en la que una vez adquirido el virus, éste se asocia

con el vector por el resto de su vida. Igualmente acotan que, estos virus requieren de mucho tiempo para su adquisición e inoculación (desde horas a días), así como, de un período de latencia que puede durar de un día a varias semanas (Anexo 5).

Asimismo, se ha encontrado que los virus de transmisión no persistente o semipersistente, están específicamente asociados con la epicutícula del canal de los estiletes (partes bucales) de los vectores, y la cutícula (incluyendo la de las partes bucales) es eliminada por el insecto durante cada muda, por ende, algún virus que se encuentre en estos órganos también se perderá (Gray y Banerjee, 1999). Todos estos virus han sido referidos como no circulativos y no son internalizados por el vector, es decir, no entran a su sistema circulatorio o no atraviesan ninguna membrana celular (Gray y Banerjee, 1999).

Sin embargo, el éxito de la transmisión de virus persistentes, requiere que el mismo se internalice en el vector una vez adquirido y que sea transportado activamente a través de múltiples membranas celulares al interior del cuerpo del vector por lo que se les define como circulativos que son retenidos después de la muda, algunos de éstos pueden multiplicarse dentro del vector (circulativo – propagativo) y otros sólo se replican en el huésped (circulativo – no propagativo), donde el vector es solo un conductor del virus de un huésped a otro (Gray y Banerjee, 1999).

Bajo todas estas consideraciones, se han propuesto tres mecanismos de transmisión de virus no circulativo. El primero es el del “virus retenido en el estilete” (stylet-borne), adaptado de la teoría del mecanismo de transmisión de virus en animales, la cual sugiere que un virus contamina la punta distal del estilete del vector, quien simplemente inoculara a la próxima planta sobre la cual se alimente. En este mecanismo de transmisión, el vector es esencialmente una “aguja”. El segundo mecanismo, propone la ingestión – excreción en el cual, los virus transmisibles se adhieren a múltiples sitios a lo largo del canal alimentario anterior del vector durante la ingestión y subsecuentemente es liberado durante los períodos de regurgitación y salivación. En este mecanismo el vector actúa como una “jeringa” más que como una “aguja”. Esta

teoría ofrece un mecanismo potencial de transmisión no circulativa pero no distingue entre los virus transportados en el ápice de los estiletes y los que llegan al aparato bucal. El tercer mecanismo, es el de ingestión – salivación la cual sostiene que el virus puede asociarse con múltiples sitios a lo largo del canal alimentario anterior, pero el único virus que se transmite, es aquel que está fijado al ápice proximal de los estiletes maxilares, donde los canales de alimentación y salival están fusionados. El virus es inoculado por la acción de salivación y regurgitación. Estos mecanismos fueron tomados de Gray y Banerjee (1999).

Todos los virus circulativos de plantas son transmitidos por artrópodos. Aun se desconoce de nematodos vectores de este tipo de virus. Como se mencionó anteriormente, los virus circulativos se dividen en dos subgrupos, virus propagativos, los cuales se pueden propagar dentro del vector, y los no propagativos. Los primeros incluyen miembros de cinco grupos de virus, de estos, tres también tienen miembros que infectan animales (*Reovirus*, *Rhabdovirus* y *Bunyavirus*). Los otros dos grupos no poseen miembros que infecten animales (*Tenuivirus* y *Marafivirus*). Los virus no propagativos incluyen entre muchos otros a los *Luteovirus* y a un solo miembro del grupo *Enamovirus*. Los *Geminivirus* son virus transmitidos de forma circulativa y aunque hay controversia, parece que son no propagativos (Gray y Banerjee, 1999).

1.3 Taxonomía de virus

Las normas para la nomenclatura en la taxonomía de virus son dictadas por el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV siglas en inglés), el cual, es una organización formada por representantes de sociedades de microbiología de muchos países, cuyos criterios son aceptados internacionalmente. De acuerdo al ICTV, en el mundo existen 70 géneros de virus de planta reconocidos, además de 14 familias en tres órdenes. De los 70 géneros, 22 aun no han sido asignados a alguna familia y son denominados “géneros flotantes” (Hull, 2004). Los criterios de clasificación de virus fueron establecidos a partir del Séptimo Reporte del ICTV publicado en el año 2000

(Fauquet y Stanley, 2003), y han continuado revisándose (Fauquet *et al.*, 2005, 2008; Brown *et al.*, 2012).

Para designar una nueva especie de virus, el nombre debe estar escrito en inglés y debe estar formado por el hospedero original en el cual fue encontrado, los síntomas y finalmente la palabra virus, el cual, debe estar escrito en letra cursiva y solo colocando mayúscula en la letra inicial de la primera palabra, el resto va en minúscula (ej. *Tomato yellow leaf curl virus*) (Fauquet y Stanley, 2003); en ocasiones, opcionalmente puede incluirse la región en la que fue encontrado (ej. *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV). En la identificación de nuevas especies, los estudios moleculares constituyen la referencia principal, para lo cual, en geminivirus es necesario secuenciar todo el genoma del virus (Fauquet y Stanley, 2003).

1.4 La Familia Geminiviridae

Todo lo que refiere a esta familia, en cuanto, descripción, características, géneros, fue tomado de Hull (2004) y Brown *et al.*, (2012) y se resume a continuación.

Geminiviridae junto con *Nanoviridae* son las únicas familias de virus de planta que tienen genoma circular de cadena simple de ADN. El genoma puede ser monopartito, es decir, en un solo componente de 2500 - 3000 nucleótidos (nt) o bipartito, o sea, dos componentes de tamaño similar (unos 2600 nt); tienen una partícula viral formada por la unión de dos icosaedros incompletos (de ahí el nombre de gemelos), que tiene un diámetro de 18-20 nm y una longitud de unos 30 nm (Figura 1). Los virus con genomas bipartitos tienen estos componentes separados en dos partículas, y por lo tanto, se requiere más de una partícula de virus para infectar una célula. Los geminivirus son responsables de una cantidad significativa de daños en cultivos de todo el mundo, cuyas epifitias están asociadas varios factores, tales como, transporte de material vegetal infectado, expansión de la agricultura hacia nuevas zonas y la dispersión y emergencia de las poblaciones de los vectores que transmiten el virus de una planta a

otra. Además, la recombinación de diferentes geminivirus infectando a una planta podría dar lugar a la emergencia de un nuevo virus.

La principal característica de los geminivirus es que su genoma comprende una secuencia no codificante, llamada región intergénica de hasta 200 nt, que contiene una secuencia conservada de nueve bases (TAATATTAC) localizada en

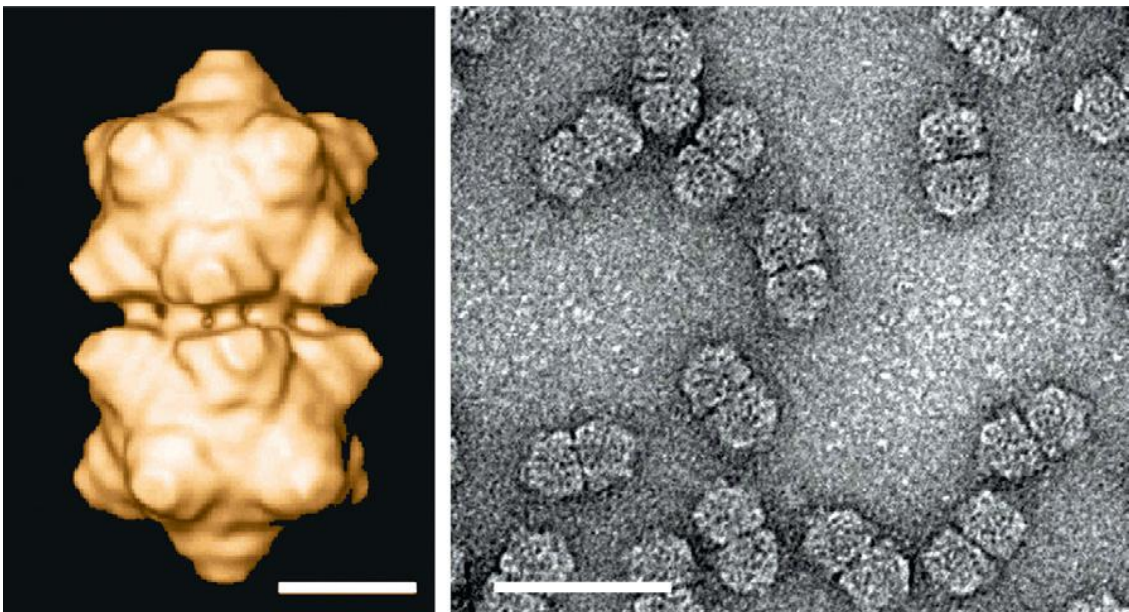


Figura 1. Reconstrucción de una partícula del virus del rayado del maíz (MSV), donde se observa un doble eje de simetría (izquierda). La barra representa 10 nm. En la imagen de la derecha se observan partículas purificadas de MSV teñidas con acetato de uranilo mostrando la típica forma de gemelos casi isométrica. La barra representa 10 nm. (Tomado de: Brown *et al.*, 2012)

una estructura de horquilla, en la que se produce la ruptura para iniciar la replicación de la molécula circular. Esta familia está conformada por cuatro géneros, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*, quienes se diferencian entre sí por la organización de sus genomas y por sus vectores, como se señala continuación:

- ***Mastrevirus***, tienen como especie tipo el *Maize streak virus* (MSV) que significa virus del rayado del maíz, y es la especie que causa la enfermedad de mayor importancia económica dentro de este género. Todos los miembros de este grupo tienen un estrecho rango de huéspedes limitados a especies vegetales de la familia *Gramineae*, a excepción de *Tomato yellow dwarf virus* (TYDV) y *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV), los cuales infectan especies dicotiledóneas. Los *Mastrevirus* son transmitidos por insectos saltahojas de manera circulativa y no propagativa y tienen genoma monopartito.
- ***Curtovirus***, género cuya especie tipo *Beet curly top virus*, (BCTV), es considerada la de mayor importancia económica en el cultivo de remolacha, aunque posee un amplio rango de hospederas en plantas dicotiledóneas. Estos virus también son transmitidos por insectos saltahojas de forma circulativa y no propagativa. Asimismo, tienen genoma monopartito.
- ***Topocuvirus***, género designado en 1999, el cual contiene una sola especie que a su vez es la especie tipo, *Tomato pseudocurly top virus*, (TPTV) la cual posee genoma monopartito. Es resultado de un desmembramiento del género *Curtovirus*, con una organización del genoma similar al mismo, pero son transmitidos solamente por la machaca, *Micrutalis malleifera*.
- ***Begomovirus***, género cuya especie tipo es *Bean golden mosaic virus* (BGMV), tienen genoma bipartito o monopartito y son transmitidos exclusivamente de manera circulativa por *B. tabaci*, además es el género más numeroso de la familia *Geminiviridae*. Ha sido el más estudiado, debido a que son los causantes de la mayoría de las epifitias en tomate y en otras especies cultivadas de gran importancia económica (yuca, algodón, caraota, frijol, etc.). Afectan un amplio rango de hospederos de especies de dicotiledóneas, y la importancia e incidencia de éste está directamente asociada a la distribución y dinámica poblacional de su insecto vector.

1.5 Organización del genoma de los Begomovirus

La mayoría de los begomovirus tienen genomas bipartitos conformados por dos componentes, designados como A y B (ADN-A y ADN-B, respectivamente) y cada componente tiene ~2.600 nt (Figura 2). Los genes del componente A están involucrados en la encapsidación y en la replicación, mientras que los genes del componente B están involucrados en el movimiento de los virus a través de la planta, en la determinación del rango de hospederos y en la expresión de síntomas (Hull, 2004).

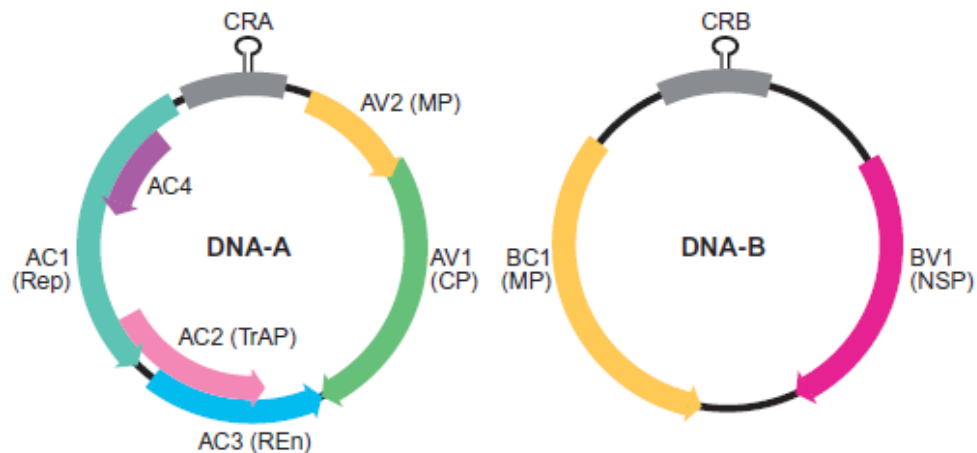


Figura 2. Organización del genoma de un begomovirus bipartito. (Tomado de: Brown *et al.*, 2012)

El componente A codifica cinco regiones, una en el sentido de virion siguiendo las agujas del reloj, llamada proteína de la cápside (CP) (antes AV1) y cuatro en sentido complementario, que están involucradas en la replicación y la expresión: la proteína asociada con la replicación (Rep) (antes AC1), la proteína activadora de la transcripción (TrAP) (antes AC2), la proteína que incrementa la replicación (REn) (antes AC3) y la proteína AC4 cuya función es desconocida en bipartitos (Stanley *et al.*, 2005). En sentido viral puede haber otra proteína, denominada AV2, que no se ha detectado en begomovirus bipartitos del Nuevo Mundo. (Bridson *et al.*, 2010).

Los dos set (sentido del virion y complementarios) de genes están separados por una región anteriormente señalada, llamada intergénica, la cual el ADN-A comienza con el codón de inicio de la Rep y termina con el codón de inicio de la CP, en el caso de begomovirus bipartitos del nuevo Mundo y de la V2 en los casos en que ésta está presente. Esta región no codifica ninguna proteína y su secuencia varía según el tipo de begomovirus, con excepción de la secuencia conservada TAATATTAC comprendida en la región desapareada de una estructura de horquilla de una longitud de ~30 nt que fue mencionada anteriormente y es común para todos los geminivirus (Stanley *et al.*, 2005). La región intergénica en los bipartitos comprende una región conocida como región común porque su secuencia es altamente conservada en ambos componentes y que comprende la estructura de horquilla (Stanley *et al.*, 2005). La CP es necesaria para la encapsidación de los viriones, la transmisión a través del vector, la estructura del virus y la especificidad del huésped. En begomovirus bipartitos, la CP no es necesaria para diseminación local o sistémica del virus, mientras que para los monopartitos la CP es esencial para la diseminación viral (Stanley *et al.*, 2005).

Con relación al componente B (ADN-B), las regiones codificantes determinan dos proteínas: la proteína nuclear Shuttling NSP (antes BV1), la cual se transcribe en el sentido de la banda viral que se encarga del movimiento dentro de la célula (citoplasma – núcleo y viceversa) y la proteína del movimiento (MP) (antes BC1) que se transcribe en el sentido de la banda complementaria, está involucrado en el traslado del genoma viral célula a célula vía plasmodesmo (Gafni y Epel, 2002). El gen MP pareciera ser un elemento de inducción de síntomas o un determinante de la patogenicidad de los begomovirus bipartitos; estudios con mutaciones sugieren que la región 3' del gen MP está asociada con el desarrollo de síntomas (Gafni y Epel, 2002).

Los begomovirus monopartitos tienen un solo componente más grande (unos 2800 nt) similar al ADN-A de los bipartitos, en el cual además de la CP, con la misma función que en los anteriores, posee un V2 (Figura 3), no presente en los bipartitos del nuevo Mundo, que se encarga del movimiento célula a célula, y en este componente se cumplen todas las funciones que están divididas en los dos componentes (A y B) en los

bipartitos. Aunque, la función del C4 en los bipartitos es desconocida, en los monopartitos, éste está involucrado en la patogénesis y expresión de los síntomas (Stanley *et al.*, 2005).

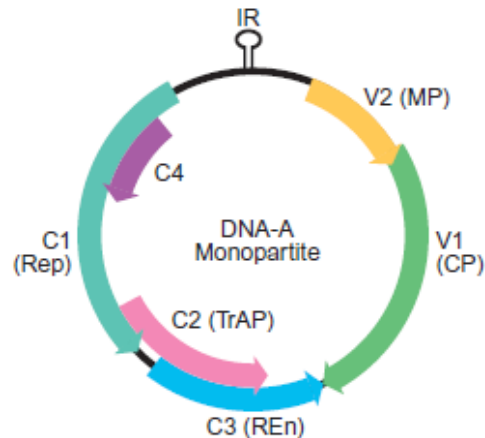


Figura 3. Organización del genoma de un begomovirus monopartito. (Tomado de: Brown *et al.*, 2012)

1.6 Importancia de Begomovirus como causantes de enfermedades de plantas

El incremento y emergencia de las enfermedades causadas por begomovirus en décadas recientes, parece estar estrechamente relacionada a la actividad humana, incluyendo la agricultura intensiva, el movimiento de plantas y material vegetal y los cambios en las prácticas hortícolas tales como la introducción de cultivos que soportan altas poblaciones de *Bemisia tabaci* (Seal *et al.*, 2006a). En condiciones tropicales, donde se cultiva durante todo el año y las poblaciones de *B. tabaci* se mantienen altas durante todo el año, la incidencia de begomovirus es mayor que en las zonas templadas donde la siembra de cultivos hortícolas y el desarrollo de esta especie se reducen a unos pocos meses el año (Polston y Anderson, 1999; Morales y Jones, 2004).

Según Morales (2006), los begomovirus, afectan a muchos cultivos importantes en América Latina, tales como: leguminosas de grano, cucurbitáceas, tomate y pimentón, desde el norte de México hasta Argentina, incluyendo toda la región del Caribe, donde la presencia de la mosca blanca (*B. tabaci*) es determinante para la ocurrencia de daños ocasionados por estos virus, sí además se toma en cuenta, su alta densidad poblacional y el gran impacto de estos virus sobre cultivos susceptibles. Afortunadamente, *B. tabaci* no tolera temperaturas por debajo de 17 °C ni precipitaciones abundantes como ocurre en la región amazónica, razón por la cual, este insecto no es una plaga importante en regiones que estén por encima de los 30° de latitud norte o sur, ni a altitudes mayores a 1200 m (Morales, 2006; Morales y Jones, 2004). Por otro lado, la transformación de zonas semidesérticas en zonas cultivables con el uso del riego (práctica comúnmente utilizada en América Latina) han conducido al desarrollo de altas poblaciones de *B. tabaci* y de enfermedades producidas por estos virus (Morales, 2006).

1.7 Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), origen y su entrada a América

A partir de 1990, fuertes epifitias distribuidas en todo el Mundo han sido atribuidas a especies de un grupo de begomovirus monopartitos causantes de la enfermedad del encrespado amarillento de la hoja del tomate (TYLCD siglas en inglés) (Geraud *et al.*, 2009). Los primeros registros de un virus de este grupo se reportan entre 1930 y 1940 en Israel, donde se describió por primera vez el virus del encrespado amarillento de la hoja del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV siglas en inglés) y coincidió con la aparición de *B. tabaci* como plaga agrícola en esa región (Varma y Malathi, 2003). Posteriormente, a finales de los ochenta comenzaron a presentarse los primeros reportes de begomovirus en Europa y América (Accotto *et al.*, 2000). Uno de los eventos más desafortunados en la historia de los begomovirus en América Latina, es la introducción desde el Viejo Mundo de TYLCV, acción que aparentemente ocurrió por la importación de plántulas de tomate infectadas desde Israel hacia República Dominicana (Polston *et al.*, 1994). En Florida, TYLCV fue reportado por primera vez en el año 1997 y un año más tarde fueron reportados en el mismo estado, pérdidas de hasta el 100%

asociadas con la presencia de este virus en el campo (Polston *et al.*, 1999). En estos casos, la cepa de TYLCV asociada con las infecciones fue la cepa IL (TYLCV-IL).

Los virus asociados a TYLCD, constituyen un complejo de begomovirus entre los que se pueden citar las siguientes especies aceptadas: *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV), *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV), *Tomato yellow leaf curl Guangdong virus* (TYLCGuV), *Tomato yellow leaf curl Indonesia virus* (TYLCIDV), *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLVKaV), *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMaIV), *Tomato yellow leaf curl Mali virus* (TYLCMLV), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV), *Tomato yellow leaf curl Vietnam virus* (TYLCVNV) y *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Díaz-Pendón *et al.*, 2010; Moriones y Navas-Castillo, 2010). En el anexo 2 se puede observar además, las cepas relacionadas con estas especies y el número de aceción de cada una.

Con la excepción de los bipartitos *Tomato yellow leaf curl Indonesia virus*, *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* y *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus*, todos los virus asociados a TYLCD tienen un genoma monopartito. Debido al hecho de que los síntomas producidos en tomate por todos los virus asociados a TYLCD son esencialmente los mismos, en este grupo se adoptó como principal criterio de diferenciación de especies la identidad de la secuencia nucleotídica completa del genoma. (Moriones y Navas-Castillo, 2010). En este sentido, el Grupo de Estudio de *Geminiviridae* del Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus, propuso un umbral de 89% de la identidad entre secuencias completas de nucleótido del ADN del componente A para establecer una nueva especie (Fauquet *et al.*, 2005; Stanley *et al.*, 2008), Asimismo, las cepas de una especie se definen por un umbral de identidad del nucleótido de 93%. (Díaz-Pendón *et al.*, 2010)

En Venezuela, la cepa Mild de TYLCV (TYLCV-Mld) fue observada en el año 2004, en campos cultivados con tomate en varias regiones del país (Zambrano *et al.*, 2007), siendo la primera cita de la presencia de un begomovirus monopartito en

Suramérica así como la primera cita de la presencia de la cepa Mild de TYLCV en el continente americano.

1.8 Transmisión de Begomovirus mediante *Bemisia tabaci*

Aunque algunos begomovirus pueden ser transmitidos mecánicamente en condiciones experimentales, la transmisión en condiciones naturales se produce a través de *B. tabaci*, de manera persistente y circulativa (Hull, 2004; Navas-Castillo *et al.*, 2011). Actualmente se han aceptado 192 especies de virus de este género que son transmitidos por *B. tabaci* y hay propuestas al menos 88 especies más (Navas-Castillo *et al.*, 2011). Para TYLCV se ha reportado la transmisión transovárica por su vector, pero, aparentemente, no se replica dentro de su cuerpo (Stanley *et al.*, 2001).

Los estados inmaduros y adultos de *B. tabaci*, cuando se alimentan, succionan el virus de plantas enfermas; el insecto adquiere el patógeno de dichas plantas en un período de 30 minutos y tras un periodo de latencia de unas 24 h necesarios para la circulación efectiva del virus hasta las glándulas salivares del insecto, puede transmitirlo a una planta sana en procesos de alimentación de 15 minutos. Asimismo, el vector puede retener al virus en su cuerpo por más de 20 días, debido a la propiedad de persistencia del mencionado patógeno (Tesoriero y Azzopardi, 2006; Cohen y Antignus, 1994).

Esto consecuentemente define una serie de períodos que hay que tomar en cuenta al realizar ensayos de transmisión mediada por *B. tabaci* entre estos: el período de acceso para la adquisición (PAA), que es aquel durante el cual los adultos son expuestos a plantas fuentes enfermas (se recomiendan unas 48 h para adquisiciones efectivas), posterior a lo cual esos adultos son expuestos durante otro período a las plantas sanas (recomiendan unas 48 h para transmisiones efectivas) a quienes se les transmitirá el virus y esto representa el período de acceso para la inoculación (PAI); los días postinoculación (DPI) son los posteriores a la inoculación en los que se realizan las observaciones de síntomas (Lapidot *et al.*, 2001).

Diversos estudios han surgido con respecto a las afectaciones producidas en plantas por la transmisión de begomovirus mediante *B. tabaci*. Entre ellas pueden comentarse las siguientes:

Ber *et al.* (1990), evaluaron el TYLCV transmitido a tomate por *B. tabaci* y midieron la susceptibilidad, desarrollo de síntomas y acumulación de ADN viral. Estos investigadores detectaron ADN viral a los 7 días y las altas concentraciones del virus principalmente en tejidos jóvenes en crecimiento y los síntomas de la enfermedad fueron observados a los 15 días postinoculación.

Otros ensayos con TYLCV han sido realizados en diferentes regiones del Mundo evaluando diferentes aspectos de la interacción insecto vector - virus (Lapidot *et al.*, 1997; Rubinstein y Czosnek, 1997; Ghanim y Czosnek, 2000; Lapidot *et al.*, 2001; Goldman y Czosnek, 2002) así como evaluación de hospederas (Polston *et al.*, 2006; Chirinos *et al.*, 2009).

1.9 Síntomas inducidos por Begomovirus

Estos síntomas varían con la cepa del virus, cultivar, edad de la planta, tiempo de infección y las condiciones ambientales, los cuales, pueden ser combinaciones de mosaico amarillo brillante, moteados y márgenes foliares cloróticos, rizado de las hojas, arrugas o pliegues en las hojas, reducción en el tamaño de las hojas, achaparrado o reducción del crecimiento, y abscisión de la flor (Morales y Anderson, 2001).

Para el caso del TYLCV, los síntomas se manifiestan en la reducción del tamaño de las hojas, acopado hacia arriba (en forma de cuchara) bordes cloróticos, moteado, abscisión floral, achaparrado, reducción de los entrenudos, por ende reducción en los rendimientos (Polston *et al.*, 1999; Moriones y Navas-Castillo, 2000). En campos de tomate en Venezuela, específicamente en los estados andinos, los síntomas frecuentes asociados con la detección de begomovirus han sido mosaicos, nervaduras cloróticas, acopamiento, encrespado y enanismo (Faria y Nava, 2009). Para TYLCV-Mld, Chirinos

et al. (2009) encontraron que en tomate, los síntomas se caracterizaron por acortamiento de los entrenudos apicales así como encrespado de las hojas terminales y amarillamiento acentuado hacia los bordes, mientras que en el caso de *Datura stramonium*, las hojas tendían a ondularse mostrando también amarillamiento intervenal algo difuso.

En plantaciones de tomate en el estado Zulia, se han observado los síntomas del tomato Venezuela virus (ToVEV) caracterizados por encrespados con ligeras variaciones cloróticas de los brotes foliares, folíolos con deformaciones longitudinalmente hacia abajo o hacia los lados, o se enrollan hacia arriba también en el sentido longitudinal, reduciéndose considerablemente su área foliar (Romay *et al.*, 2010). Igualmente, estos investigadores refieren, acortamiento de entrenudos y raquis de las hojas y con frecuencia se engruesan y tuercen, resultando en el enanismo y deformación foliar de la planta. No obstante, en experimentos de transmisión del ToVEV a cultivares de tomate se han observado mosaicos amarillentos, iniciados desde nervaduras cloróticas (Chirinos *et al.*, 2012).

1.10 *Bemisia tabaci* Gennadius

La mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), es el insecto plaga más importante de este grupo en el continente y el Mundo (Figura 4). Se presenta entre 0 y 1000 msnm atacando a muchos cultivos, sobre todo de las familias *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Solanaceae*; además de ser el único vector de begomovirus en dicha familia (Caballero, 1996; Gianessi *et al.*, 2003), cuyo incremento se asocia principalmente a las condiciones climáticas (Jones, 2003; Morales, 2006). Coloniza más de 500 especies de plantas en 74 familias botánicas (Greathead, 1986). De hecho, en Meso América ataca por lo menos a 71 especies de plantas de las cuales 17 son cultivos y 54 son plantas silvestres, pertenecientes a 39 familias (Hilje, 1995). Por otro lado, *B. tabaci* puede transmitir 304 especies de virus (212 aceptadas), pertenecientes a cinco géneros de cinco familias, entre los cuales sobresale el género *Begomovirus* de

la familia *Geminiviridae*, que comprende unas 280 especies mundialmente (200 aceptadas y 80 propuestas) (Navas-Castillo *et al.*, 2011).



Figura 4. Adulto de *Bemisia tabaci* (Gennadius)

La ingestión y transmisión de virus de planta por mosca blanca ocurre durante su alimentación y sólo los virus que son habitantes especializados de ciertos tejidos o células de los haces vasculares, son ingeridos, aunque no todos son transmitidos. La relación entre el virus y la mosca blanca, es específica para el vector y el patógeno viral, como ocurre con los begomovirus de la familia *Geminiviridae*. (Brown y Czosnek, 2006)

En Venezuela, al evaluar la preferencia de mosca blanca en cinco cultivos agrícolas, se determinó que los mayores promedios de huevos y ninfas vivas se consiguieron en el cultivo de tomate, lo cual indica la alta afinidad entre dicho cultivo y *B. tabaci* (Morales y Cermelli, 2001). Por otro lado, Salas y Arnal (2001), en el año 1998 enviaron muestras de ninfas preservadas en etanol al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Cali, Colombia y los resultados obtenidos les permitieron reportar por primera vez la presencia del biotipo B de *Bemisia tabaci* en tomate, melón, pepino y auyama en dos importantes regiones hortícolas del país (estado Lara: 96% y estado Aragua: 4% de las muestras procesadas)

En un estudio hecho por Linares (1997), donde trató los aspectos epidemiológicos del virus del mosaico amarillo del tomate (ToYMV o Potato yellow mosaic virus, PYMV,

como lo denomina actualmente el ICTV) y su vector *B. tabaci* en el cultivo de tomate agroindustrial en Venezuela definió doce nuevas hospederas para dicho insecto, estas fueron: *Ipomoea trifida* (K.) Gedon, *I. arasifolia* (Desr.) Roem et Schuler, *Jaquemontia* sp. *Merremia aegyptia* (L.), *Simsia foetida* (Av.) sf Blake, *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, *Parthenium hysterophorus* L., *Amaranthus dubius* Mart., *Datura stramonium* L., *Wissadula periplocifolia* Presl., *Acalypha ostryifolia* y *Phaseolus pilosus*. Igualmente, con base a la sintomatología, reportó como hospederas del ToYMV: *I. trifida* (K) Gedon, *Jaquemontia* sp., *P. hyterophorus* L. y *A. dubius* Mart.

Debido a la diversidad genética intraespecífica dentro de su biogeografía, *B. tabaci* fue considerada como una “especie compleja” con al menos 20 biotipos (Chu *et al.*, 2008), sin embargo, en una publicación reciente, De Barro *et al.* (2011) aseguran que existen suficientes evidencias para considerarla un complejo de al menos 24 especies morfológicamente indistinguibles. La nomenclatura para definir esas especies crípticas está conformada por el nombre *Bemisia tabaci* mas una abreviatura que está asociada con el origen biogeográfico del anteriormente llamado biotipo. En este trabajo, las transmisiones fueron hechas con el biotipo B (Romay *et al.*, 2010) el cual adaptándolo a la nueva nomenclatura se trata de *B. tabaci* MEAM1 que esto último significa Middle East Asia Minor 1. Esta nueva adaptación para los individuos de *B. tabaci* utilizados en los ensayos fue posteriormente referida por Romay *et al.* (2011).

La condición polífaga del biotipo B de este insecto permite la transmisión de TYLCV en el campo tanto a especies cultivadas de solanáceas (Polston *et al.*, 2006; Kashina *et al.*, 2002) así como a especies pertenecientes a otras familias botánicas (Navas-Castillo *et al.*, 1999), que en Venezuela se utilizan como cultivo de rotación o se siembran en conjunto con el cultivo del tomate. Este virus puede también ser transmitido a plantas de crecimiento espontaneo (Sánchez-Campos *et al.*, 2000; García-Andrés *et al.*, 2006; Chirinos *et al.*, 2009), las cuales también crecen asociadas con los campos cultivados con tomate y por tanto podrían constituir reservorios sintomáticos o asintomáticos de dichos virus (Umaharan *et al.*, 1998; Jordá *et al.*, 2001; Salati *et al.*, 2002).

1.11 Colonias de *Bemisia tabaci* libres de virus y plantas fuentes de TYLCV y ToVEV en la Unidad Técnica Fitosanitaria (UTF), La Universidad del Zulia (LUZ).

1.11.1 Para TYLCV

La siguiente información fue tomada y resumida de Geraud *et al.* (2009) de trabajos realizados en la UTF LUZ y señala el establecimiento de plantas fuentes del TYLCV-Mld, identificación del agente causal, biotipo del vector, colonias de moscas virulíferas y colonias de moscas libres de virus.

Para mantener una colonia libre de TYLCV-Mld fueron utilizadas plantas sanas de algodón, *Gossypium hirsutum* L., de aproximadamente un mes de edad. El algodón ha sido reportado como planta no hospedera a TYLCV. Para el mantenimiento de la colonia, las plantas fueron infestadas, cada tres semanas, con adultos de mosca blanca recién emergidos. Dichas plantas fueron colocadas dentro de jaulas entomológicas de madera (0,53 m x 0,53 m 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 m x 0,53 m, largo x ancho) e iluminadas artificialmente combinando en un panel de 125 cm x 45 cm (largo x ancho) cuatro tubos fluorescentes de 40 w y cinco bulbos incandescentes de 60 w, con una duración de 12 horas luz, sin excluir la luz natural.

Los adultos recién emergidos, fueron colectados con un succionador de boca y transferidos a otra jaula entomológica similar a la descrita, conteniendo cuatro plantas de algodón sanas (para alimentarse y oviponer). Para descartar la presencia de begomovirus en las plantas de algodón se extrajo ADN total a partir de 10 mg de muestras de ápices disecados, usando el protocolo descrito por Gilbertson *et al.*, (1991) y se analizó la posible amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 550 pares de bases (pb) correspondiente a la región central del gen que codifica la proteína de la cápside de los begomovirus, utilizando los cebadores degenerados AV494 y AC1048 de Wyatt y Brown (1996), lo cual resultó negativo. Una vez descartada la

presencia de begomovirus en las plantas de algodón utilizadas para levantar la colonia de *B. tabaci*, ésta se consideró apta para la realización de los ensayos de transmisión.

La identificación del biotipo de *B. tabaci* de la colonia libre de virus fue confirmada mediante amplificación parcial y análisis del gen mitocondrial mtCOI que codifica para la enzima citocromo oxidasa I.

Para el establecimiento de las plantas fuentes del virus. Una planta de aproximadamente cuarenta días de edad con marcados síntomas de encrespado amarillento fue colectada en sembradíos de las márgenes del río Limón (ubicado al noroeste del estado Zulia), el 26-III-2004 (código de muestra: 2004-03-26-07), posteriormente fue transplantada a un matero (con capacidad aproximada para 3 kg de suelo) y mantenida dentro de una jaula-umbráculo similar a las ya descritas. Para transmitir el agente causal de los síntomas de la planta colectada, cuarenta adultos recién emergidos de *B. tabaci* criados sobre plantas de algodón fueron colocados por un período de 72 h sobre ramas cortadas de la planta fuente y posteriormente colocadas por 48 h en cuatro nuevas plantas de tomate (10 individuos/planta) de aproximadamente un mes de edad cultivadas dentro otras jaulas umbráculo. Estas nuevas plantas fueron colocadas dentro del laboratorio en jaulas entomológicas como las anteriormente descritas (Anexo 6).

Una vez detectada la presencia de begomovirus en las plantas infectadas se procedió a la eliminación de otros posibles virus no persistentes y semipersistentes, trasmisibles por *B. tabaci*. Para ello, cuando las nuevas plantas de tomate mostraron síntomas de encrespado amarillento y las ninfas criadas en esas plantas se encontraban en la fase final de N4 (“pupa” ojos visibles a través del integumento), éstas fueron despegadas y colocadas en cápsulas Petri hasta la emergencia del adulto. Los nuevos adultos fueron inmediatamente transferidos a plantas sanas de tomate para la transmisión del virus adquirido durante la fase ninfal, lo que asegura la transmisión exclusiva de begomovirus a las plantas sanas debido a que los mismos son transmitidos por *B. tabaci* únicamente de manera circulativa. Los crinivirus transmitidos

por *B. tabaci* de manera semipersistente, requieren que el insecto adquiera el virus como adulto para ser transmitidos por regurgitación. Los virus no persistentes y los semipersistentes no penetran en el insecto más allá de los estiletes y del estomodeo, respectivamente. Por tal razón, con el proceso de muda todos estos tipos de virus no circulativos son eliminados con la exuvia del insecto.

Cuando esas plantas de tomate mostraron los síntomas de la enfermedad viral, se procedió a tomar muestras de ápices, para la extracción de ADN total por el método descrito por Gilbertson *et al.* (1991) y su posterior análisis mediante la amplificación de 550 pb por PCR tal como fue referido para algodón. El producto amplificado fue secuenciado y se identificó preliminarmente el virus como TYLCV. No obstante, con el objeto de precisar la identidad del virus se utilizaron los cebadores específicos KL04-06_TYLCV CP F y KL04-07_TYLCV CP R, los cuales amplifican un fragmento de 851 pb correspondiente a la secuencia completa del gen que codifica la proteína de la cápside del begomovirus TYLCV, utilizando los cebadores desarrollados por Ling *et al.* (2006). Las muestras tomadas de las plantas fuentes del virus resultaron positivas a begomovirus cuya secuencia mostró 99% de identidad nucleotídica con el aislado de TYLCV Mild [Portugal], para el fragmento de 550 pb. Adicionalmente, la presencia de TYLCV fue confirmada con la secuencia del fragmento de 851 pb obtenido con los cebadores específicos que abarca la secuencia completa del gen de la cápside la cual mostró 96% de identidad nucleotídica con el aislado de TYLCV-Mild recientemente reportado en Venezuela por Zambrano *et al.* (2007). La secuencia realizadas para TYLCV de muestras obtenidas de las plantas fuentes de este virus mantenido en la UTF, LUZ, fue recientemente depositada en el banco de genes (GenBank, siglas en inglés), la cual quedó registrada con el No. de acceso JX025074 (Chirinos *et al.*, 2012).

1.11.2 Para ToVEV

En otro laboratorio en similares condiciones a las ya descritas para el TYLCV, se mantiene ToVEV sobre plantas de tomate (Chirinos *et al.* 2012). Este virus fue

colectado de plantas muestreadas en el estado Táchira en julio de 2007, y fue iniciada y mantenida de la misma forma como se han mantenido las plantas de TYLCV. Para confirmar la presencia del ToVEV, se siguió un procedimiento similar al del TYLCV, pero en este caso se amplificó un fragmento de 1300 pb correspondientes a la región común y a parte de los genes AV1 y AC1, utilizando los cebadores degenerados AV1978 y AC715 diseñados por Rojas *et al.* (1993). La secuenciación de este fragmento mostró un 95% de identidad nucleotídica con el ToVEV descrito por Guzmán *et al.* (1997). Esta secuencia también fue recientemente depositada en el banco de genes (Genebank, siglas en inglés) quedando referida con el número de accesión JX025075 (Chirinos *et al.*, 2012).

1.12 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (siglas en inglés), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original o molde (Hull, 2004).

El proceso ocurre a través de una serie de ciclos de amplificaciones, cada uno consistiendo en la separación de la doble cadena de las moléculas de ADN en la presencia de cebadores de oligonucleótidos y de los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP) a altas temperaturas (desnaturalización o separación de las cadenas de ADN), la hibridación de los cebadores con las secuencias complementarias en la cadena simple del ADN a bajas temperaturas (alineamiento) y la extensión del cebador con la ADN polimerasa (elongación o síntesis del ADN). Durante cada ciclo, la secuencia entre los cebadores es duplicada, de tal manera que después de n ciclos, se podría tener una amplificación de 2^n . Usualmente, la reacción es de 30 a 50 ciclos. (Hull, 2004)

El proceso de la PCR se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación. En primer lugar es necesario que el ADN se desnaturalice, es decir, que

las dos cadenas de ADN se separen, esta primera fase se conoce como desnaturalización y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94°C. El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al ADN molde. Esta segunda fase se conoce como hibridación. Temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 60°C. Por último, en la fase de elongación o extensión, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72°C. (Pérez de Castro, 1995)

Estas tres fases constituyen un ciclo de la PCR que produce únicamente una copia de un pequeño fragmento del ADN molde. En este primer ciclo, los fragmentos generados no tienen el mismo tamaño: la copia de cada una de las cadenas se inicia, a partir del extremo 3', en el punto en el que el cebador hibrida con el ADN molde y termina en el momento en el que la enzima polimerasa no es capaz de añadir más nucleótidos (es decir, que la nueva cadena formada no tiene un tamaño definido). La especificidad de la PCR depende, fundamentalmente, de la temperatura empleada en la fase de hibridación y de la cantidad de iones divalentes que se incorporan a la reacción (además de depender de la secuencia de los cebadores). (Pérez de Castro, 1995)

La selección del cebador depende de la secuencia del ADN a amplificar y es absolutamente esencial que el nucleótido 3' sea complementario al nucleótido deseado en la secuencia en cuestión. Por lo general los cebadores poseen entre 18 y 25 bases de longitud y soportan temperaturas entre 55 y 65 °C. (Hull, 2004)

En resumen, para realizar la técnica se necesitan:

- Los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP), sustratos para polimerizar nuevo ADN.

- Dos cebadores o iniciadores (primers), oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia. Delimitan la zona de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.
- Iones divalentes. Se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso (Mn^{2+}), para mutagénesis de ADN mediante PCR, ya que altas concentraciones de Mn^{2+} incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN. Actúan como cofactores de la polimerasa.
- Iones monovalentes, como el potasio.
- Una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70 °C (la más común es la polimerasa Taq).
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- Termociclador, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo.

CAPÍTULO II. INVENTARIO DE BEGOMOVIRUS EN TOMATE EN VENEZUELA

2.1 Introducción

El primer paso para manejar enfermedades virales, es el conocimiento de su diversidad en un lugar geográfico determinado. Desde que en Venezuela, a fines de los ochenta, las afecciones virales en tomate se convirtieron en el principal problema fitosanitario limitante de la producción de este cultivo hortícola, se comenzaron a realizar los primeros inventarios de virosis en diferentes zonas de Venezuela, utilizando principalmente para detectarlos, la técnica de ELISA y sondas de hibridación (Nava *et al.*, 1996, 1997, 1998a, 1998b).

Parte de las muestras obtenidas durante la recolección en la zona Andina del país fueron analizadas para detección de begomovirus, de las cuales, el 18% de éstas mostraron este tipo de virus y cuyas secuencias parciales arrojaron que estaban muy relacionadas con PYMV y ToVEV (Nava *et al.*, 2006). Posteriormente utilizando cebadores genéricos se realizaron otros inventarios de begomovirus para la misma zona (Faria y Nava, 2009).

Más recientemente han sido referidas la caracterización del *Euphorbia mosaic Venezuela virus* (Zambrano *et al.*, 2012) así como la caracterización y distribución del *Tomato yellow margin leaf curl virus* (ToYMLCV) en estados productores de tomate en Venezuela, como aporte al conocimiento de los diferentes begomovirus que afectan la producción de cultivo en el país (Nava *et al.*, 2012).

Hasta ahora, generalmente los resultados que se presentan son puntuales por zonas productoras o por virus específicos. Es por ello que es necesario tener una visión más completa de las virosis que pueden estar afectando las diferentes zonas productoras de tomate en Venezuela, lo cual acompañado con otras prácticas, pueden ayudar a disminuir más efectivamente el impacto de estas afecciones virales.

Dentro de este orden de ideas, el presente trabajo tuvo como principal objetivo realizar un análisis de las secuencias parciales de begomovirus para muestras de plantas de tomate, con aparentes síntomas de virosis, de diferentes zonas productoras de cultivo en Venezuela recolectadas durante diez años de muestreos, para determinar con que virus están relacionados.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Colección de muestras de hojas

Durante el período marzo 2000 - noviembre 2009 fueron colectadas un total de 279 muestras de plantas de tomate que mostraban síntomas de rizado de hojas, mosaicos amarillos, amarillamiento de venas en las hojas, clorosis intervenales, moteados cloróticos, entre otros. Estas muestras fueron colectadas en 73 campos de 55 municipios en 17 de los 23 estados de Venezuela (Cuadro 2; Figura 5; Anexos 3 y 4) los campos de cultivo identificando las plantas con posibles afecciones virales que mostraban la sintomatología arriba señalada (en promedio se recolectaron unas 30 muestras por año). Las plantas fueron codificadas, incluyendo en el código la fecha del muestreo en sentido inverso (año-mes-día) seguido del número de la muestra para ese día. Previo a la toma de muestras, las plantas fueron fotografiadas para documentar fotográficamente el estado de las mismas.

Con el fin de evitar riesgos de contaminación entre muestras, la mano con la cual era cortado el tejido vegetal, era cubierta con un guante de polietileno muy fino, de los utilizados para manipular alimentos en expendios al público. Una vez utilizado el guante era desechado. Estas muestras eran colocadas dentro de una copa de papel secante moldeado contenida dentro de un envase de plástico transparente (2,8 × 4,5 cm, diámetro × altura, dimensiones internas) con tapa enroscada, conteniendo silica gel como desecante en la mitad inferior, esto con el fin de evitar deterioro de las proteínas por putrefacción. Ese mismo código de las plantas fotografiadas, fue colocado en el

envase plástico para guardar correspondencia, entre la planta fotografiada y la muestra tomada.

Para acelerar la deshidratación de la muestra, evitar oxidación de tejidos y desarrollo de hongos, cada 12-24 h, según la necesidad (cambio de color por hidratación), al envase le era cambiada la sílica gel por nueva deshidratada, operación que era repetida hasta que no hubiese cambio de color en la misma. En el laboratorio, las muestras ya bien deshidratadas, fueron divididas en dos submuestras, preservadas, cada una en un vial de 2 ml conteniendo sílica gel. Una de estas, era llevada para diagnósticos. La otra es guardada bajo refrigeración (-21 °C), como referencia a futuro, así como respaldo para procedimientos adicionales de diagnósticos. En todo caso, cada sub-muestra contiene material en exceso de acuerdo al necesario para la realización de los análisis moleculares pertinentes (aproximadamente 0,15-0,2 gr).

Cuadro 2. Regiones de Venezuela donde se colectaron muestras para el inventario de begomovirus

Región	Estados	Número de municipios visitados	Número de localidades visitadas	Número de muestras recolectadas
Occidente	Fa, La, Zu	16	23	117
Los Andes	Me, Ta, Tr	18	21	71
Los Llanos	Ba, Co, Po	9	15	51
Central	Ar, Ca, Mi, Va, Ya	7	8	22
Oriente	Mo, NE, Su	5	6	18
Total	17	55	73	279

* Nombre abreviado de los estados: Falcón (Fa), Lara (La), Zulia (Zu), Mérida (Me), Táchira (Ta), Trujillo (Tr), Barinas (Ba), Cojedes (Co), Portuguesa (Po), Aragua (Ar), Carabobo (Ca), Miranda (Mi), Vargas (Va), Yaracuy (Ya), Monagas (Mo), Nueva Esparta (NE), Sucre (Su).

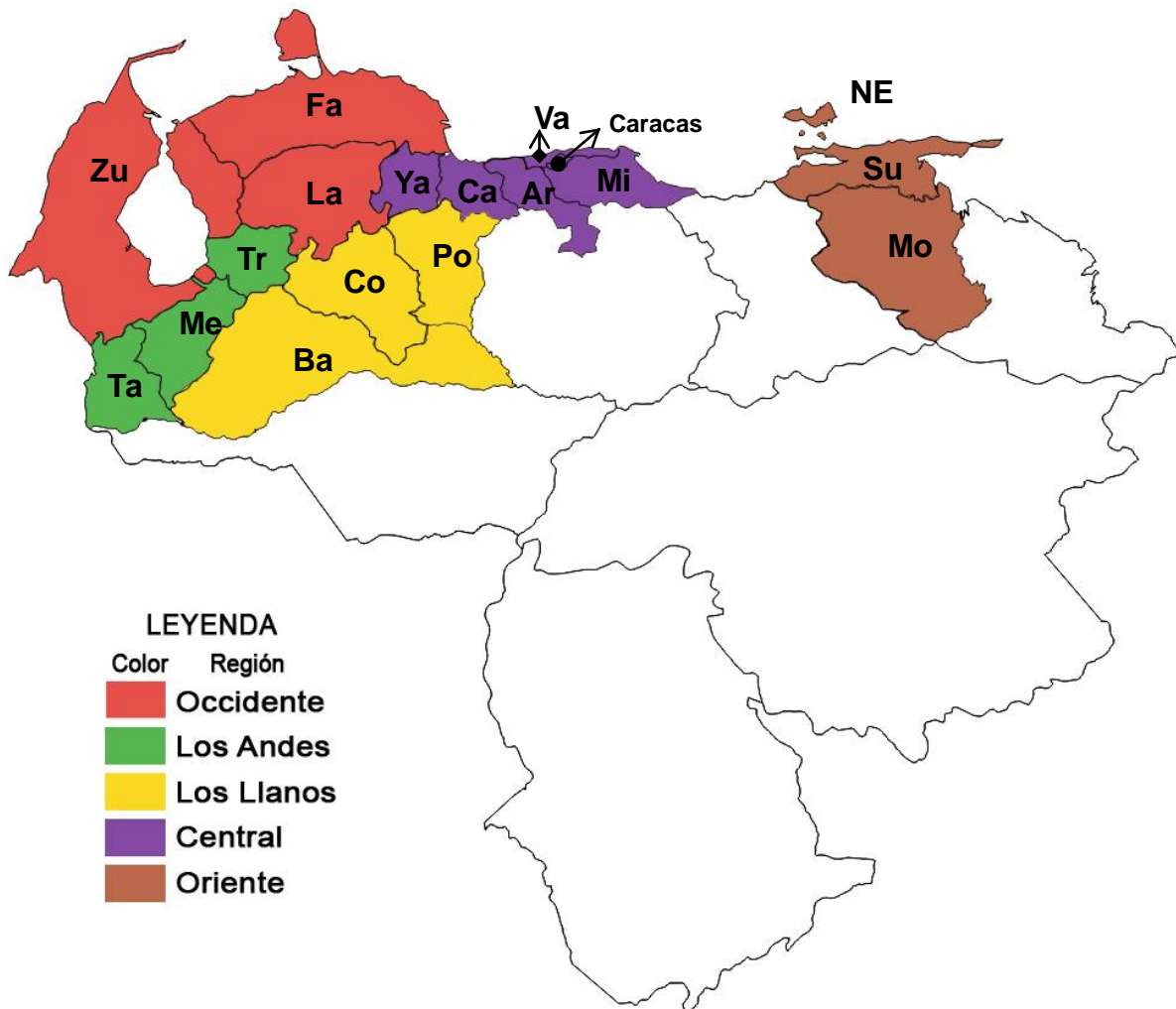


Figura 5. Regiones de Venezuela donde se colectaron muestras para el inventario de begomovirus. **Occidente:** Zulia (Zu), Falcón (Fa), Lara (La); **Los Andes:** Táchira (Ta), Mérida (Me), Trujillo (Tr); **Los Llanos:** Barinas (Ba), Cojedes (Co), Portuguesa (Po); **Central:** Yaracuy (Ya), Carabobo (Ca), Aragua (Ar), Vargas (Va), Miranda (Mi); **Oriente:** Nueva Esparta (NE), Sucre (Su), Monagas (Mo).

2.2.2 Extracción de ADN y detección de begomovirus por PCR

Tanto la extracción de ADN, la PCR como el secuenciamiento fueron realizados en el Laboratorio de Proteómica y Genómica de la Fundación de Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y

Tecnología, sector Hoyo de la Puerta, Valle de Sartenejas, municipio Baruta del estado Miranda.

2.2.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo de Gilbertson *et al.* (1991) con modificaciones, tal como se detalla a continuación:

- 1.- Aproximadamente 1 mg de tejido de la muestra deshidratado y preservado en un recipiente hermético con sílica gel, fue macerado en 500 μ l de solución tampón de extracción frío (50 mM EDTA, 500 mM NaCl y 10 mM 2 mercaptoetanol).
- 2.- A la solución con el macerado se agregaron 33 μ l de SDS al 20% p/v, se agitó en vortex hasta mezclar y luego se incubó por 10 minutos a 65°C.
- 3.- Seguidamente se agregaron 160 μ l de Acetato de Potasio 5 M a pH 4,5, mezclando por inversión y luego se centrifugó por 10 minutos a 10.000 x g.
- 4.- Del sobrenadante se recolectaron 0,6 ml y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- 5.- Al sobrenadante recolectado se le añadieron 300 μ l de Isopropanol, mezclando cuidadosamente por inversión y luego se centrifugó por 10 minutos a 10.000 x g.
- 6.- Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 1 ml de Etanol al 70%, centrifugando de nuevo la mezcla a 10000 x g, pero en esta ocasión solo por 5 minutos.
- 7.- El sobrenadante se descartó y el precipitado fue resuspendido en 250 μ l de TE (10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA a pH8).

2.2.2.2. Detección de begomovirus por PCR

Una vez extraído el ADN, se procedió a su amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores AV494 y AC1048 para el fragmento de 550 pares de bases (pb) de la región central del gen que codifica la cubierta proteica (CP) del virus, diseñados por Wyatt y Brown (1996).

Para las muestras que resultaron positivas a los cebadores de 550 pb, se utilizó un segundo par de cebadores, PAL1v1978 y PAR1c715, para amplificar un fragmento de unos 1300 pb que comprende parte del gen de la proteína de la capsida (AV1 ORF), la región común (CR) y parte del gen de la Rep (AC1 ORF) para el componente A del ADN viral (Rojas *et al.*, 1993). Debido al hecho de que este último par de cebadores no fueron capaces de amplificar los begomovirus monopartitos, tal como ya ha sido referido en un inventario de tomate realizado en Irán (Fazeli *et al.* 2009), y aunque resultaron positivos para los cebadores de 550 pb, se procedió a la utilización de un tercer par de cebadores KL04-06CPF y KL04-07CPR, para estas muestras (Ling *et al.*, 2006), dichos cebadores amplifican un fragmento de 851 pb correspondiente a la secuencia completa del gen que codifica la CP del begomovirus TYLCV.

La amplificación se realizó utilizando 25 µl de componentes de la reacción que contenían 20 mM Tris HCl, 100 mM KCl, 0,2 mM de cada dNTP, 10 µM de cada cebador, 2 mM MgCl₂, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Promega, Madison, WI) y 1 µl del extracto del ADN de cada muestra. Esta reacción fue utilizada para todos los cebadores mencionados anteriormente.

Las condiciones del termociclador utilizadas consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos: a 94 °C por 45 segundos (desnaturalización) - 55 °C por 20 segundos (alineamiento) cada uno para luego culminar con un ciclo de 73°C por 30 segundos para la extensión. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PTC200 MJ Research. Los productos obtenidos de la PCR fueron analizados por electroforesis de un gel de agarosa al 1% en

una solución tampón de Tris-Acetato (TAE, 50 mM Tris-acetato, 10 mM EDTA, pH 8,0). En cada bolsillo del gel se colocaron 9 μ l del producto de la PCR y 1 μ l del marcador de peso molecular según el cebador utilizado, luego se realizó la separación por tamaños mediante electroforesis a 100 voltios por 20 minutos, tras la que se tiñó el gel con Bromuro de Etidio (1 μ g/ml) para la observación de los fragmentos de ADN a la luz ultravioleta.

2.2.2.3 Secuenciamiento de los productos positivos

Los fragmentos de PCR obtenidos con los cebadores PAL1v1978 - PAR1c715 y KL04-06CPF y KL04-07CPR fueron directamente secuenciados en ambos sentidos. Dichos productos de PCR se secuenciaron por medio de electroforesis capilar en un analizador genético modelo ABI PrismTM 310 (Applied Biosystems, CA). Los fragmentos secuenciados fueron comparados por BLAST con las secuencias disponibles en el banco de genes GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). El programa DNAMAN versión 5.2.2 (Lynnon BioSoft, Quebec, Canada) fue utilizado para el análisis de la comparación. Los begomovirus seleccionados del GenBank para el análisis de comparación se muestran en los Cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Número de accesiones del GenBank y acrónimos de las secuencias del ADN-A de los begomovirus bipartitos disponibles en las bases de datos de acceso público y empleados en las comparaciones realizadas en este estudio

Número de Accesoión	Acrónimo	Begomovirus
D00940-D00941	PYMV-[VE]	Potato yellow mosaic virus
AF026464 ¹	ToVEV-[VE]	Tomato Venezuela virus
AY508993-AY508994	TYMLCV-[VE]	Tomato yellow margin leaf curl virus
AY508991-AY508991	MeMV-[VE]	Merremia mosaic virus
AY927277-EF547938	ToMYLCAV-[VE]	Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus
EU021216	RhYMYuV-[MX]	Rhynchosia goldenmosaic Yucatan virus

¹En este caso se incluye la única secuencia disponible, que es una secuencia parcial

Cuadro 4. Número de accesiones del GenBank y acrónimos de las secuencias de los begomovirus monopartitos incluidas en este estudio de comparación de ADN y análisis filogenéticos

N° Accesoión	Acrónimo	Begomovirus
DQ302033	TYLCV- [VE]	Tomato yellow leaf curl virus (Venezuela ¹)
AJ223505	TYLCV-[CU]	Tomato yellow leaf curl virus- Cuba
AB014346	TYLCV-[JA]	Tomato yellow leaf curl virus- Japan
AF024715	TYLCV-[DO]	Tomato yellow leaf curl virus- Dominican Republic
AY134494	TYLCV-[PR]	Tomato yellow leaf curl virus- Puerto Rico
AY319646	TYLCV-[GP]	Tomato yellow leaf curl virus- Guadalupe
AM282874	TYLCV-[CN]	Tomato yellow leaf curl virus- China
DQ631892	TYLCV-[MX]	Tomato yellow leaf curl virus- Mexico
AY530931	TYLCV-[US:FI]	Tomato yellow leaf curl virus- United States:Florida
X76319	TYLCV-Mld[IL]	Tomato yellow leaf curl virus-Mild-Israel
AF105975	TYLCV-Mld[PT]	Tomato yellow leaf curl virus-Mild- Portugal
X15656	TYLCV[IL]	Tomato yellow leaf curl virus-Israel

¹Zambrano *et al.*, 2007

2.3 Resultados y discusión

El análisis de las secuencias parciales del componente A de los begomovirus bipartitos y monopartitos detectados en las muestras colectadas en el país durante los diez años de muestreos permite aproximar a qué virus están relacionados. Del total de muestras colectadas con aparentes síntomas de infección por begomovirus, el 66,7% (186 de 279 colectadas) resultaron positivas al fragmento de aproximadamente 550 pb amplificado con los cebadores AV494-AC1048. El alto porcentaje de muestras positivas de begomovirus, mostró una alta asociación entre los síntomas observados en el

campo y la presencia de virus. Al menos una muestra de cada campo visitado fue positiva con este par de cebadores.

Por otro lado, las reacciones de PCR conducidas con los cebadores PAL1v1978 y PAR1c715, indicaron que el 91,9 % de las muestras en las que se había detectado presencia de begomovirus con los cebadores de 550 pb dieron positivas al fragmento de ~1300pb (171 de 186 muestras), mientras que las 15 muestras restantes que resultaron negativas con estos cebadores, fueron positivas a TYLCV con los cebadores KL04-06CPF y KL04-07CPR, previamente utilizados por Zambrano *et al.* (2007) para la primera descripción de este begomovirus monopartito en Venezuela. Esto corrobora lo referido en la sección de materiales y métodos donde en un inventario de begomovirus de tomate hecho en Irán, Fazeli *et al.* (2009) detectaron que los begomovirus monopartitos no amplificaron con los cebadores diseñados por Rojas *et al.* (1993).

2.3.1 Análisis de comparación de secuencias parciales y virus relacionados

Los ADN amplificados por la PCR con fragmentos de ~1300pb y ~850pb fueron secuenciados en ambas direcciones. El análisis de electroferograma reveló que el 22% (41 de 186 positivas) de las muestras tenían doble señal de nucleótido, lo cual indicaba una posible infección por una mezcla de begomovirus. Estas muestras fueron excluidas de los análisis de secuenciación en este estudio, lo cual será objeto de un trabajo posterior. El resto de las secuencias obtenidas (145) no mostraron ambigüedades nucleóticas y fueron comparadas con las secuencias de ADN de begomovirus disponibles en la base de datos del GenBank. La búsqueda BLAST basada en la identidad de la secuencia nucleótida (NSI siglas en inglés) para el ADN del componente A, mostró relación con secuencias de un begomovirus monopartito y seis bipartitos, previamente descritos en plantas de tomate, con la excepción de RhGMVYV, descrito en dos malezas de la familia *Fabaceae* (Ling *et al.*, 2006).

En el cuadro 5 se muestran los resultados de estos análisis de comparación de las secuencias, en el mismo se puede notar que 15 de las 145 secuencias (10,3%) tuvieron valores de NSI menores al 89% con la secuencia correspondiente de los begomovirus reportados en el GenBank, lo cual sugiere la posible presencia de nuevas especies potenciales de begomovirus en las plantaciones de tomate en Venezuela, puesto que 89% es el límite de identidad nucleotídica establecido para el genoma completo para la diferenciación de especies en el caso de begomovirus (Fauquet *et al.*, 2008). En estos casos, por tanto, sería interesante la obtención del genoma completo. En el resto de los casos, los fragmentos analizados presentan porcentajes de homología superiores al 89% con begomovirus bipartitos del Nuevo Mundo ya descritos anteriormente y que sugiere que las muestras pueden estar infectadas por begomovirus relacionados con éstos, que han sido incluidos en el cuadro 5. En este último caso es importante señalar que solamente se dispone de secuencias de fragmentos parciales y por tanto solo se pueden señalar en las muestras, la relación de estos virus con los descritos y que solamente la obtención de la secuencia completa del ADN-A podrá confirmar la suposición establecida. Esto es muy importante en el caso de los begomovirus en los que se conoce que es frecuente la existencia de ADN quimeras resultantes de fenómenos de recombinación (Padidam *et al.*, 1999).

En el anexo 1 se detalla la identidad nucleotídica para el fragmento secuenciado de las muestras positivas tomadas de plantas de tomate y su relación con los virus descritos, con base a los números de accesión que se mostraron en el cuadro 3. Asimismo, en ese anexo se señalan, la zona, el municipio y el estado donde fueron colectadas.

Los resultados muestran que el mayor porcentaje (44,8%) de muestras están relacionadas con varias razas de PYMV, con un alto porcentaje de identidad para el fragmento secuenciado, lo que sugiere que virus similares a éste son lo más abundantes en las epidemias que afectan a tomate en Venezuela. Además fueron detectados en todas las regiones estudiadas y el NSI del fragmento secuenciado se ubicó entre 92% y 99% (Anexo 1).

Cuadro 5. Begomovirus relacionados con los descritos respecto al fragmento amplificado así como la identidad de la secuencia nucleótida (NSI) para las muestras de las diferentes regiones de Venezuela. Periodo 2000-2009

Begomovirus	R. Oc.	R. An.	R. LI.	R. Ce.	R. Or.	Total	Porc¹.	NSI²
PYMV	21	25	9	5	5	65	44,8	94
ToVEV	11	3	0	6	1	21	14,5	94
MeMV	3	3	3	4	3	16	11,0	94
TYLCV-Mld	12	1	1	1	0	15	10,3	98
ToYMLCV	0	2	5	0	0	7	4,8	94
ToMYLCAV	2	1	1	0	0	4	2,8	91
RhGMYV	0	0	2	0	0	2	1,4	93
Baja Homología	7	4	2	1	1	15	10,3	< 89
Total						145	100	

¹ Porcentaje de muestras con respecto al total de las 145 analizadas.

² Porcentaje corresponde al promedio de las identidades entre razas detectadas y las muestras analizadas.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en un inventario de begomovirus realizado para la zona andina de Venezuela, donde la mayor parte de las muestras colectadas que resultaron positivas con el fragmento de 1300 pb mostraron una cercana relación con razas de PYMV (Nava *et al.*, 2006).

Virus relacionados con ToVEV y MeMV mostraron una identidad nucleotídica promedio de 94% cada uno, con amplitudes de identidad nucleotídica: 90 – 95% y 94 – 99%, respectivamente, asociado con porcentajes de incidencia de 14,5 y 11,0 %, ubicándolos como segundo y tercer virus mas frecuente, respectivamente. En el mismo inventario realizado por Nava *et al.* (2006) obtuvieron que tres de las doce muestras

positivas para el fragmento de 1300 pb (25% del total de positivas) estaban relacionadas con ToVEV, mientras que en este estudio, las muestras cuyo fragmento analizado, lo relaciona con este virus, resultaron las segunda en importancia después del PYMV con un 14,5% del total de muestras positivas a begomovirus. Es importante señalar que en este estudio el número de muestras analizadas fue mayor, así como, se muestreó en mayor número de estados y zonas productoras del país, comparado con el estudio realizado por Nava *et al.* (2006)

Las muestras positivas relacionadas con TYLCV en los fragmentos secuenciados, representaron el 10,3% del total, resultando el cuarto más frecuente encontrado después de PYMV, ToVEV y MeMV (Cuadro 5). Las secuencias obtenidas de estas muestras tiene estrecha vinculación con TYLCV-Mild de Portugal (número de accesión: AF105975) y el TYLCV-Mld de Japón [JR:Aic] (número de accesión: AB014346) (Anexo 1), con las cuales tuvieron una NSI de 98 % en ambos casos.

En el cuadro 5 se puede notar que la distribución geográfica de los virus que allí se señalan es prácticamente la misma en todas las regiones, con la excepción de la Región Oriental donde no se detectaron los virus TYLCV-Mld, ToYMLCV, ToMYLCAV ni RhGMVYV; y la Región Central donde no se detectaron los tres últimos mencionados. También se debe destacar la predominancia de los virus PYMV, ToVEV y TYLCV-Mld e la Región Occidental, así como de PYMV en la Región de Los Andes.

En este sentido, en el Cuadro 6 y la Figura 6, se muestran la localidad, el municipio y el estado donde fueron encontradas las muestras que contenían virus relacionados con TYLCV-Mld. Antes del año 2007 el TYLCV, no había sido reportado para Venezuela (Zambrano *et al.*, 2007). Hasta donde se tiene conocimiento, solo en el reporte de ese año y en este estudio han sido detectadas muestras relacionadas con TYLCV en Venezuela.

Según Morales y Anderson (2001), TYLCV fue introducido al Nuevo Mundo a través de la República Dominicana y rápidamente fue diseminada a otras islas del

Caribe. No obstante, los aislados del TYLCV venezolano corresponden a TYLCV-Mild, el cual difiere del los de TYLCV-IL descritos en República Dominicana y demás países americanos (Lefeuvre *et al.*, 2010). Este resultado confirma la suposición de múltiples introducciones de TYLCV a América propuesta por Duffy y Holmes (2007).

Cuadro 6. Presencia de TYLCV-Mild en el total de muestras de tomate analizadas con infección simple. Período 2000-2009

Código	Localidad	Municipio	Estado
2000-12-27-01	La Cepeda	Jesus E. Lossada	Zulia
2001-05-18-01	Caño San Andrés	Mara	Zulia
2003-12-07-06	Quibor	Jimenez	Lara
2003-12-29-01	La Cepeda	Jesus E. Lossada	Zulia
2003-12-29-02	La Cepeda	Jesus E. Lossada	Zulia
2004-12-10-01	La Cepeda	Jesus E. Lossada	Zulia
2004-12-11-01	La Cepeda	Jesus E. Lossada	Zulia
2004-12-11-04	La Cepeda	Jesus E. Lossada	Zulia
2006-04-11-03	Muchuche	Carache	Trujillo
2006-07-12-01	San Gerónimo	Cocorote	Yaracuy
2006-07-24-05	La Barinesa	Bolívar	Barinas
2007-02-01-03	Fca. Luz Marina	Mara	Zulia
2007-02-01-04	Fca. Luz Marina	Mara	Zulia
2007-03-16-02	La Cepeda	Jesus E. Lossada	Zulia
2007-03-16-03	La Cepeda	Jesus E. Lossada	Zulia

En cuanto a aislados similares a ToYMLCV fueron detectados en siete de las 145 muestras (4,8%), específicamente en las regiones de los andes y los llanos (Anexo 1). Aislados similares a ToMYLCAV tuvieron una incidencia de 2,8%, cuyas muestras fueron tomadas en la región occidental, andes y llanos, mientras que para RhGMYuV fue el 1,4% detectadas en los llanos (Anexo 1).

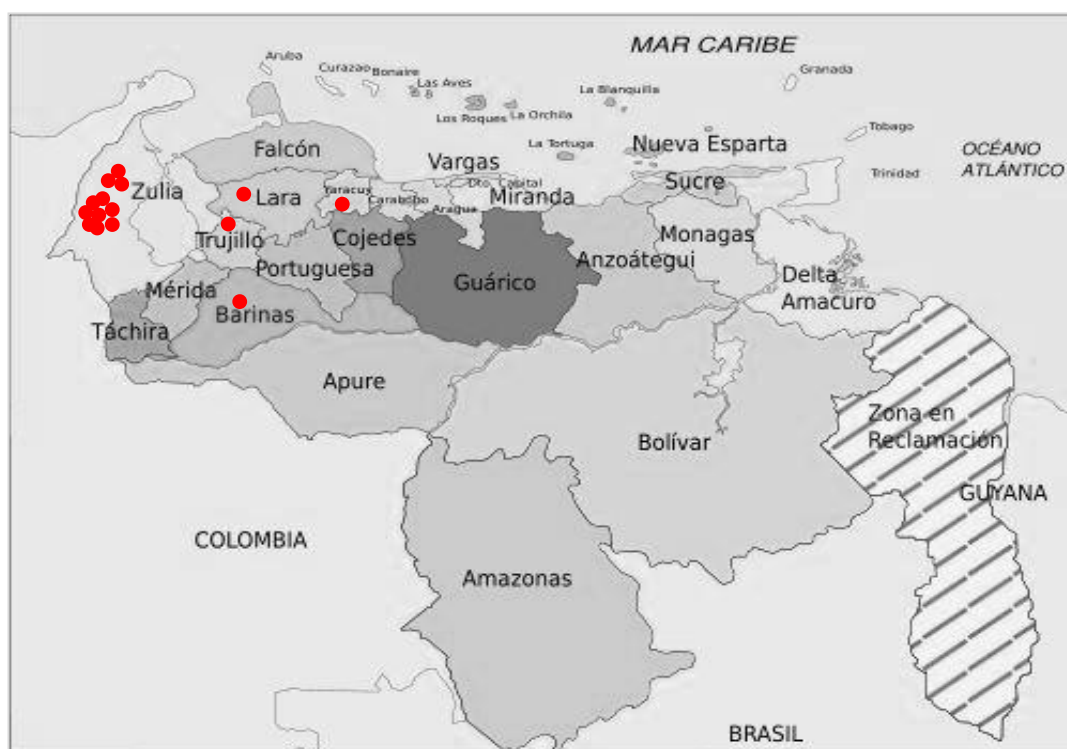


Figura 6. Presencia de TYLCV en diferentes estados de Venezuela

En el estudio de distribución del TYMLCV realizado por Nava *et al.* (2012), lo encontraron en los estados Mérida, Guárico y Aragua que se corresponden con la región andina, los llanos y central respectivamente, mientras que este estudio, muestras que resultaron estar relacionadas con este virus fueron encontradas en Trujillo, Cojedes y Portuguesa (Anexo 1) que se corresponden con las regiones andina y los llanos, respectivamente. Vale destacar que el componente A y B de este virus está relacionado

con el *Tomato leaf deformation virus* (Nava *et al.*, 2012) un nuevo virus descrito para Perú causando severas infecciones en tomate en ese país (Marquez-Martin *et al.*, 2011).

En estudios previos, donde han sido detectados begomovirus infectando tomate en Venezuela, se refieren al menos unos seis begomovirus bipartitos (Coutts *et al.*, 1991; Guzmán *et al.*, 1997; Nava *et al.*, 2006; 2012; Zambrano *et al.*, 2011; 2012) y la introducción del monopartito TYLCV-Mld (Zambrano *et al.*, 2007). Tal como lo detectado en esos estudios, los resultados aquí obtenidos sugieren la diversidad de begomovirus afectando tomate en Venezuela, donde predominan los bipartitos originarios del nuevo Mundo.

Este tipo de estudios sobre diversidad de begomovirus en tomate en Venezuela representa un importante aporte al conocimiento de la dinámica y distribución de begomovirus como base fundamental para programas de mejoramiento de genotipos de tomate y/o evaluación de los existentes mejorados para otros virus con fines de seleccionar aquellos que resulten tolerantes o resistentes a los begomovirus mas frecuentemente encontrados. En otras palabras, esta información es esencial para el diseño de estrategias de control más estables y duraderas (Seal *et al.*, 2006b) a los fines de disminuir consistentemente el impacto negativo que tienen sobre la producción de tomate este tipo de enfermedades virales, los cuales desde finales de los años ochenta de la pasada década se han convertido en los principales problemas que afectan sensiblemente el rendimiento de este cultivo hortícola en Venezuela.

CAPÍTULO III. TRANSMISIÓN EXPERIMENTAL DE TYLCV-MLD MEDIANTE *Bemisia tabaci* A PLANTAS DE CRECIMIENTO ESPONTANEO Y CULTIVADAS COMO POSIBLES HOSPEDERAS ALTERNAS DEL VIRUS

3.1 Introducción

Las fuentes más importantes de virus de plantas son, precisamente, las plantas infectadas; un amplio rango de huéspedes provee a los virus mayores oportunidades para perpetuarse y diseminarse, de forma que, las hospederas silvestres continúa siendo un tópico controversial de investigación y discusión sobre la evolución y epidemiología de los begomovirus entre virólogos. (Morales *et al.*, 2000). En lo que respecta a los hospederos alternos de begomovirus la información que existe no es tan amplia como la generada sobre las investigaciones básicas en este tipo de patógenos, o en la generada de la evaluación de la resistencia de cultivares comerciales de tomate. A continuación se señalan algunos ejemplos de investigaciones realizadas sobre hospederos alternos de estos virus

Debrot y Centeno (1985), observaron en Aragua, Venezuela, síntomas típicamente virales en siembras de papa y tomate que generalmente se distribuían hacia las borduras de las mismas, sugiriendo que la infección provenía de fuentes externas. Como ambas especies se cultivaban comúnmente en la misma finca y durante la misma época del año, les fue posible apreciar la contrastante diferencia entre la baja frecuencia de aparición de esa sintomatología en papa y la elevada frecuencia con que se manifestaba en tomate. Esa misma sintomatología también la notaron en plantas de *Lycopersicum esculentum* var. cerasiforme, un tomatillo silvestre, el cual es bastante común en la zona y es considerado una maleza. Los mismos investigadores observaron esos síntomas en pequeñas parcelas experimentales y plantas de crecimiento espontáneo de la especie *L. pimpinellifolium*.

Por otro lado, Abdel (1991), reportó como hospederos del TYLCV en Egipto las especies no cultivadas como *Eruca sativa* Lam., *Xanthium strumarium* L., *Sonchus oleraceus* L., *Whitania somnifera* (L) Dun., *Euphorbia geniculata* Ort., *Chenopodium*

murale L. y *Sisymbrium officinale* (L) Scop. Asimismo, Sánchez-Campos *et al.* (1999), en España, analizó más de 520 muestras de malezas, pertenecientes a 38 especies de plantas (incluyendo tres del género *Amaranthus*) de 20 familias, para la presencia de infecciones por TYLCV-Sr y TYLCV-Is durante el otoño de 1997 y 1998. Los resultados mostraron que las infecciones por este virus en las malezas fue muy esporádica, al punto que sólo plantas de dos especies resultaron positivas: *Datura stramonium* L. y *Solanum nigrum* L.

En un estudio llevado a cabo por el Centro Internacional para la Agricultura Tropical (CIAT) en Palmira, Colombia, las especies silvestres: *Aspilia tenella* (*Compositae*), *Desmodium uncinatum*, *Macroptilium lathyroides*, *Rhynchosia minima* (*Leguminosae*), *Malva* sp., *Malvastrum* sp., *Sida rhombifolia* (*Malvaceae*), *Euphorbia prunifolia* (*Euphorbiaceae*), *Melochia villosa* (*Sterculiaceae*) y *Pavonia* sp. (*Boraginaceae*) fueron utilizadas como posibles hospedadoras de begomovirus desconocidos para pruebas de transmisión biológica con *B. tabaci*. Los resultados obtenidos arrojaron que todas las plantas evaluadas contenían begomovirus capaces de infectar caraota (*Phaseolus vulgaris*) (Morales *et al.*, 2000).

Asimismo, evaluaciones para la búsqueda de huéspedes alternativos de TYLCV, donde se analizaron 210 muestras de 95 especies de malezas utilizando la PCR; las siguientes especies resultaron positivas: *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker, *Convolvulus* sp., *Cuscuta* sp., *Chenopodium murale* L., *Datura stramonium* L., *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter, *Malva parviflora* L., y *Solanum nigrum* L., los cuales además de ser huéspedes naturales, resultaron asintomáticos (Jordá *et al.*, 2001). En este sentido, Seal *et al.* (2006a) plantean que sería muy interesante, llevar a cabo estudios sobre virus en malezas o malas hierbas en agroecosistemas tropicales donde el cultivo hortícola se hace durante todo el año y donde hay una gran abundancia de cultivos y malezas que pueden fungir como huéspedes alternos al virus.

En un estudio desarrollado en Brasil, encontraron que las malezas *Amaranthus spinosus*, *A. viridis*, *Ageratum conyzoides* y *Bidens pilosa* resultaron ser hospederas

naturales de begomovirus bipartitos. Asimismo, al hacer la retransmisión del virus, en forma mecánica y por injerto, desde estas malezas a plantas de tomate, sólo resultaron positivas aquellas plantas que fueron inoculadas por injerto (Arnaud *et al.*, 2007).

Chirinos *et al.* (2009) utilizando *B. tabaci*, hicieron ensayos de transmisión experimental de TYLCV-Mld a dos especies de plantas cultivadas y cinco de crecimiento espontáneo; de estas últimas solo *Datura stramonium* mostró síntomas de la enfermedad. Más recientemente, Papayiannis *et al.* (2011) realizaron en Chipre, un muestreo intensivo de campo para detectar la presencia de TYLCV en plantas silvestres encontrando un gran número de éstas como hospederas naturales del mismo. Mientras que Romero *et al.* (2012) en un estudio de transmisión experimental del bipartito ToVEV mediante *B. tabaci* a varias especies de plantas, detectaron que *D. stramonium* (Solanaceae), *Amaranthus dubius* (Amaranthaceae) y *Cucumis anguria* (Cucurbitaceae) son potenciales hospederas alternas de este virus en tomate.

La importancia de los huéspedes silvestres como fuente de diversidad genética de begomovirus que pueden afectar a cultivos de importancia económica también ha sido puesta de manifiesto en diversos estudios, por ejemplo en Brasil, para la especie *Cleome affinis* (Silva *et al.*, 2012) o en España para *Solanum nigrum* L. (García-Andrés *et al.*, 2006).

Según los resultados del inventario realizado en Venezuela mencionados anteriormente (Capítulo II), 15 de las 145 muestras de tomate infectadas con begomovirus analizadas mostraron una cercana relación con el TYLCV-Mld ubicándolo como el cuarto más frecuente. Dado que para el begomovirus bipartito ToVEV ya fueron hechas transmisiones experimentales mediante *B. tabaci* a varias especies de plantas para evaluarlas como posibles hospederas (Romero *et al.*, 2011), en esta tesis el objetivo fue evaluar varias especies de plantas de crecimiento espontáneo comunes en campos de tomate de Venezuela como potenciales hospederas del begomovirus monopartito TYLCV-Mld.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1 Área y condiciones de estudio

Los ensayos de transmisión fueron realizados durante el período marzo 2008 - julio 2009 en condiciones de laboratorio (T: $26 \pm 3,72$ °C, HR: $82 \pm 3,69\%$) combinado con umbráculo (jaulas-umbráculo), en el exterior del laboratorio (T: $34 \pm 4,25$ °C, HR: $86 \pm 3,58\%$), en la Unidad Técnica Fitosanitaria (UTF), Facultad de Agronomía, LUZ, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. En ambas condiciones la amplitud de temperatura entre la noche y el día es poco significativa.

3.2.2 Plantas evaluadas

Se evaluaron diez especies de plantas comunes en Venezuela asociadas con plantas cultivadas (Figuras 7 y 8), pertenecientes a las familias: *Amaranthaceae*: bledo, *Amaranthus dubius* Mart.; *Capparidaceae*: platanito, *Cleome spinosa* Jacq.; *Malvaceae*: tapaleche, *Sida aggregata* Presl.; bejuco negro, *Merremia aegyptia* (L.); *Euphorbiaceae*: tripa de pollo, *Euphorbia hirta* L.; *Solanaceae*: hierba mora, *Solanum americanum* Mill.; tomate silvestre, *S. pimpinellifolium* L. y ñongué morado, *Datura stramonium* L.; además de las cultivadas, pimentón, *Capsicum annuum* L. y tomate, *S. lycopersicum* L. Esta última además de ser el hospedero cultivado afectado por el virus en estudio (TYLCV-Mld) fue utilizado como testigo positivo. La identificación de estas especies fue confirmada por el Herbario de la Facultad de Agronomía, La Universidad del Zulia "Omar Zambrano" (HERZU)

En el caso de tomate, fueron utilizadas semillas de la variedad Rio Grande (Petoseed Co. Inc., Saticoy) y en el caso de pimentón se colectaron las semillas de frutos maduros del cultivar California Wonder. Las semillas de las plantas silvestres evaluadas fueron colectadas de plantas en los alrededores de campos de tomate en el estado Zulia, ubicado al noroccidente del país (Figura 9) y guardadas bajo refrigeración. Las semillas de las especies *Sida aggregata* y *Merremia aegyptia*, presentaron dificultad para germinar, lo que llevó a la utilización de plántulas colectadas en los

terrenos de la Ciudad Universitaria, LUZ y del Centro Frutícola del Zulia, respectivamente. Las semillas fueron sembradas en bandejas iniciadoras de polietileno de 30 x 62 cm con 128 receptáculos, llenadas con sustrato a base de turba de musgo (Sunshine Plug Mix 5, Sun Gro Horticulture Inc. Bellevue, Washington, EE.UU.) y



Figura 7. Especies de plantas evaluadas: a. *Datura stramonium*, b. *Amaranthus dubius*, c. *Sida aggregata*, d. *Merremia aegyptia*

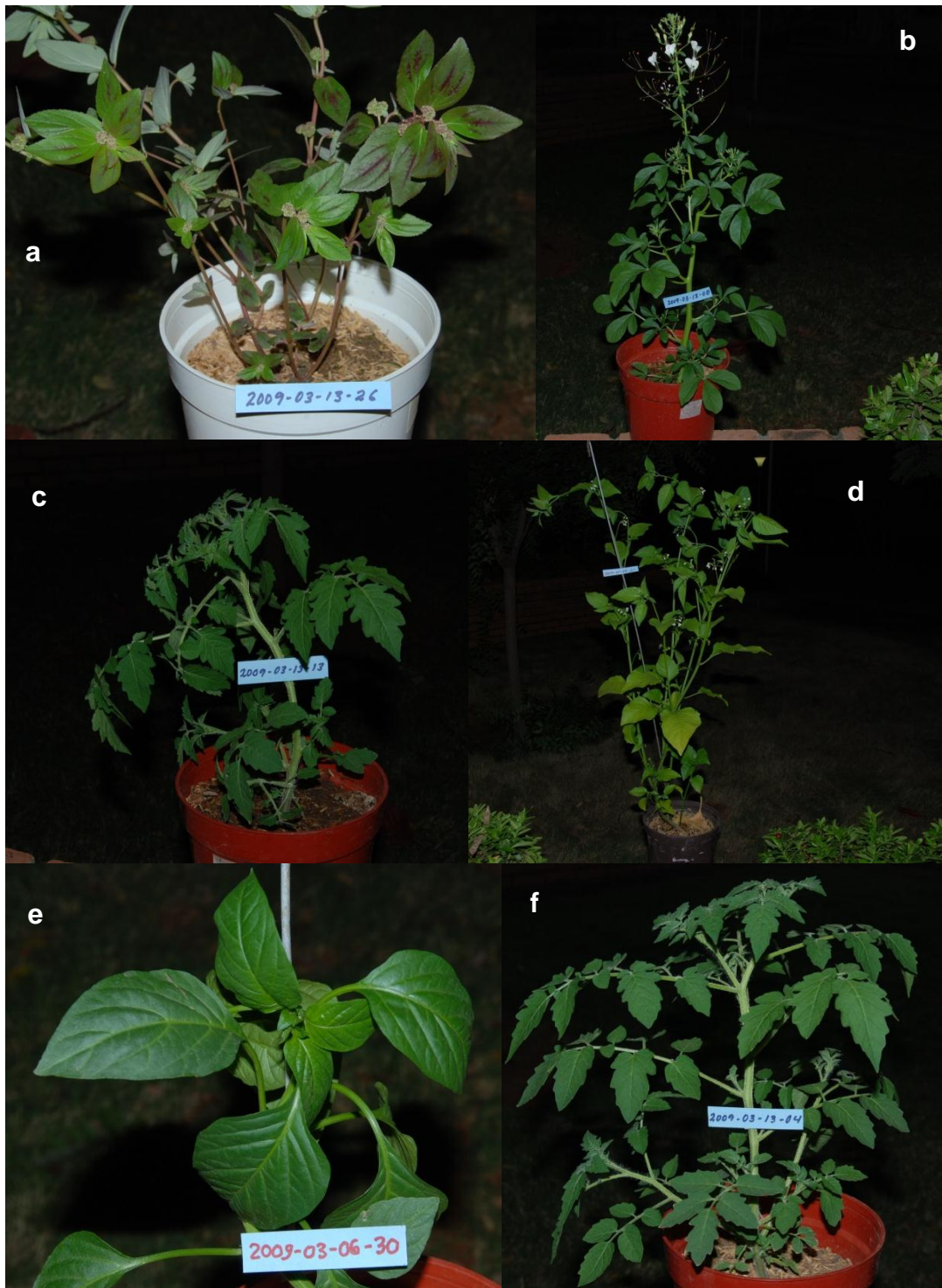


Figura 8. Especies de plantas evaluadas: **a.** *Euphorbia hirta*, **b.** *Cleome spinosa*, **c.** *Solanum pimpinellifolium*, **d.** *Solanum americanum*, **e.** *Capsicum annuum*, y **f.** *Solanum lycopersicum*.

mantenidas dentro del laboratorio, en las jaulas entomológicas de madera (0,53 m x 0,53 m 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 m x 0,53 m, largo x ancho) y envueltas en bolsas negras de polietileno hasta completar la germinación.



Figura 9. Mapa indicando la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, ubicada en la región noroccidental de Venezuela. El círculo señala el sector más importante de producción de tomate en dicho estado. (Disp: <http://geologiavenezolana.blogspot.com/p/mapas-geologicos.html>)

3.2.3 Procedimiento experimental de la transmisión

Una vez germinadas las plantas, las bandejas fueron transferidas a jaulas umbráculos (2,3 m x 1,12 m x 0,63 m; largo x ancho x alto) con estructura de perfiles de aluminio cerradas con malla de nylon muy tramada (18 x 18 hilos/cm²) colocada sobre un mesón de estructura de tubos galvanizados (0,75 m de altura), en el exterior del laboratorio. Para el caso de *Sida aggregata* y *Merremia aegyptia*, las plántulas traídas de campo fueron trasplantadas a las bandejas antes mencionadas. Bajo esa condición se mantuvieron por 15 días, tiempo durante el cual, se le hicieron dos

fertilizaciones (una semanal) con un producto de alta solubilidad (Solub®, 18-18-18), a razón de 10 cc por planta de la solución preparada a una concentración de 2 g/litro de agua. Posteriormente, las plantas fueron sacadas de las bandejas con el cepellón (raíces junto al sustrato de turba) y fueron colocadas en vasos plásticos de 475 cc contentivos de un sustrato esterilizado formado por una mezcla de suelo areno-francoso y materia orgánica vegetal descompuesta, en proporción 2:1. Este procedimiento se hizo con el fin de hacer los ensayos de transmisión.

Las plantas fueron expuestas a dos condiciones de adultos de *B. tabaci*: libre de virus (moscas no virulíferas) que son mantenidos sobre plantas de algodón y aquellos criados sobre plantas de tomate fuentes de TYLCV (moscas virulíferas). El biotipo B (o *B. tabaci* MEAM 1) fue el utilizado durante este experimento. El mantenimiento de plantas de algodón, de tomate, cría de *B. tabaci* y determinación del biotipo fue previamente referido (ver Capítulo I).

En cada condición, individualmente las plantas fueron expuestas a 25 adultos de *B. tabaci* recién emergidos (24 h). Para garantizar la edad de los adultos tanto virulíferos como no virulíferos, a las plantas de algodón y fuentes de tomate infectadas con TYLCV-Mld que serían utilizadas en los experimentos, se les retiraba manualmente todos los adultos existentes y seguidamente eran colocadas por separado en otras jaulas entomológicas ya descritas y a las 24 horas se procedía con las infestaciones con los adultos recién emergidos. Para la exposición individual, cada planta se colocó en el interior de una jaula cilíndrica de plástico transparente (sección de envase de gaseosa de 2 litros, 10 cm x 15 cm, diámetro x altura) con el tope cerrado con organza. Los adultos fueron colectados con un succionador de boca, los cuales, se introdujeron dentro de la jaula, colocando al pie de la planta, un tubo de vidrio del succionador con el cual fueron colectados, destapados boca hacia arriba donde se dejaron alimentarse sobre las plantas por un periodo de acceso para la inoculación (PAI) de 48 h, posterior al cual, se retiraron las jaulas plásticas (Anexo 7).

Tras el retiro de las jaulas, para eliminar los adultos, las plantas fueron asperjadas con una solución de imidacloprid (Relevo 500) preparada a 0,04% de ingrediente activo y luego fueron trasplantadas a macetas de 2 kg de capacidad de suelo, que estaba conformado de tres partes de arena y una parte de abono de río. Adicionalmente, y para evitar al máximo la llegada de nuevos adultos y el desarrollo de colonias de *B. tabaci* sobre las mismas, se le aplicó al suelo, 10 cc del mismo insecticida a la misma concentración. Se ha demostrado que en plantas tratadas al suelo con imidacloprid, no hay desarrollo de poblaciones de *B. tabaci* por al menos 30 días (Chirinos *et al.*, 2011). Seguidamente, las macetas fueron nuevamente colocadas en las jaulas umbráculos mencionadas anteriormente (Anexos 8 y 9). Para disminuir la desecación de las plantas, una vez sembradas se le colocaba encima del suelo, cascarilla de arroz. Las plantas eran regadas a diario y fertilizadas dos veces por semana, con el mismo fertilizante utilizado en semillero y a la misma concentración. Allí, comenzaron las observaciones diarias a diferentes días post inoculación (DPI) para detectar la aparición de síntomas de infección, hasta 30 días después, estimándose así el día de aparición de síntomas.

Dado que las mencionadas especies fueron expuestas por separado a dos condiciones de moscas, se evaluó un total de veinte tratamientos en tres repeticiones, utilizándose 10 plantas por cada repetición para las tratadas con moscas virulíferas y cinco por repetición para aquellas plantas inoculadas con moscas no virulíferas, totalizando unas 450 plantas. Adicionalmente, se estimó por repetición para cada especie el porcentaje de plantas sintomáticas [(número de plantas con síntomas / número total de plantas inoculadas) x 100]. Para este último se obtuvieron tres valores para cada especie correspondiente a cada repetición.

Finalmente, para cada una de las especies de plantas que resultaron sintomáticas fueron caracterizados los síntomas observados en las mismas.

3.2.4 Retransmisión

Con el fin de evaluar la posible condición de fuente del virus, para aquellas especies que resultaron sintomáticas, se realizó la retrasmisión a tomate mediante la utilización de moscas blancas no virulíferas criadas sobre algodón. Para ello, tres a cinco plantas sintomáticas por repetición fueron escogidas y colocadas por separado en jaulas entomológicas descritas anteriormente. En cada jaula se colocaron 400 moscas aproximadamente, para el periodo de acceso para la adquisición (PAA) y así asegurar la transmisión a 10 plantas de tomate por cada planta sintomática utilizando 25 moscas por planta. Asimismo, como testigo, se sometieron cinco plantas de tomate por repetición a condiciones similares pero con moscas sanas, criadas sobre plantas de algodón. Para la retrasmisión se procedió de la misma manera que en los ensayos de transmisión.

3.2.5 Toma de muestras de tejidos vegetales y del vector

Previo a la eliminación de los adultos con insecticida, se colectaron moscas virulíferas y no virulíferas con las que se realizaron los ensayos de transmisión, para cada especie de planta evaluada por repetición, los cuales se colocaron en alcohol etílico al 99%. De esto, por cada condición se hizo una muestra compuesta de 50 adultos aproximadamente con el fin de detectar o descartar la presencia de ADN viral. El resto de las muestras se conservan en el congelador (-20°C) en viales de 2 ml como respaldo (Anexo 10). Con el objeto de confirmar la transmisión del agente viral observado inicialmente por la aparición de síntomas, así como, para descartar la existencia de especies asintomáticas en aquellas plantas sometidas a moscas virulíferas, se tomaron seis muestras de ápices foliares por repetición en plantas que resultaron sintomáticas, e igual número de muestras se tomaron en los testigos. Para las especies que resultaron asintomáticas, se tomaron dos tipos de muestras, una compuesta proveniente de las diez plantas por repetición y una individual, tomando muestras de cada una las plantas evaluadas en el ensayo. Sí en los análisis moleculares la muestra compuesta hubiese resultado positiva, se tenía previsto hacer

análisis individualizados para estimar el número y porcentaje de plantas infectadas. Por el contrario si resultase negativa, no se harían análisis adicionales.

Antes de la utilización de plántulas de *Sida aggregata* y *Merremia aegyptia*, se tomaron muestras, de tal manera que serían analizadas en caso de resultar positivas posterior a los ensayos de transmisión, para así descartar la posibilidad que se hubiesen infectado previamente en campo,. Asimismo, se tomaron muestras de las plantas fuente de TYLCV-MIId con las que se realizaron estos estudios para cotejar la identidad del virus presente en éstas con la identidad del virus detectado en las plantas a las que se le realizó la transmisión. Igualmente se tomaron muestras de las plantas de algodón *G. hirsutum*, donde fueron mantenidas las moscas libre de virus.

Para la toma, preservación y respaldo de muestras se procedió de la misma forma que con las muestras tomadas para en el inventario

3.2.6 Extracción de ADN vegetal y en *Bemisia tabaci*

Para la extracción de ADN de las muestras de plantas se procedió como se señaló anteriormente utilizando el protocolo de Gilberston *et al.* (1991) con las modificaciones también señaladas. En el caso de las muestras de *B. tabaci*, de la muestra tomada tanto para los adultos considerados virulíferos como para los libres de virus, en viales de 2 ml de microcentrifuga por condición se colocaron unas 50 moscas virulíferas en nitrógeno líquido y luego le agregó la solución de extracción de ADN del protocolo usado por Frohlich *et al.* (1999). Aunque los mejores individuos transmisores son hembras adultas y como no se distinguió entre ambos sexos, se aseguró la presencia de hembras en la muestra tomada aumentando el número de individuos. En una muestra aleatoria de 50 individuos se asegura la presencia de hembras adultas dada la reproducción de tipo arrenotoquia (tipo de reproducción basada en mayor proporción de hembras que machos en la especie) (Louise, 1975).

Así pues, siguiendo el protocolo de extracción de ADN los adultos de *B. tabaci* se trituraron con un micromortero en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y con 60 μ l de una solución tampón de lisis fría (5mM de Tris-HCl a pH 8; 0,5mM de EDTA; 0,5% v/v de Nonidet P40 y 0,1 mg/ml de Proteinasa K). Posteriormente, la solución fue incubada a 65 °C por 15 minutos y seguidamente a 95 °C por 10 minutos. Luego la solución se centrifugó a 10.000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se colocó en un nuevo tubo de microcentrífuga para ser usado como fuente de ADN para la PCR.

3.2.7 Detección de begomovirus por PCR y Southern blot

Para la detección de ADN viral en las plantas utilizadas en las transmisiones y en los adultos de *B. tabaci* analizados, se utilizaron los cebadores degenerados AV494 y AC1048 diseñados por Wyatt y Brown (1996) anteriormente referidos. Adicionalmente para la detección del TYLCV existente en las plantas fuentes se utilizaron los siguientes cebadores específicos KL04-06CPF y KL04-07CPR diseñados por Ling *et al.* (2006), y un par de iniciadores específicos para la raza TYLCV-Mld desarrollados por Lefeuvre *et al.* (2007).

En el estudio de transmisión experimental, *Amaranthus dubius* resultó positiva a TYLCV (Güerere *et al.*, 2012). Dado que esta especie hasta ahora no ha sido reportada como hospedero de este virus, además de realizarse experimentos de retransmisión, se realizaron una serie de análisis adicionales para demostrar que es un hospedero potencial de TYLCV-Mld. Por un lado se analizaron las plantas positivas utilizando los cebadores degenerados arriba referidos, tal como se hizo para las plantas fuente de virus. Además, se realizaron análisis Southern blot a muestras de plantas infectadas, utilizando sondas específicas para TYLCV, con el fin de determinar los niveles de acumulación y la presencia de estados replicativos del virus para así confirmar la condición de hospedero. Todos los análisis moleculares fueron realizados en el IDEA, con excepción del último análisis que fue hecho en el Instituto del Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Algarrobo, Málaga, España.

3.2.8 Análisis estadísticos

Para los estudios de transmisión y retransmisión, en las variables: tiempo de aparición de síntomas y porcentaje de plantas sintomáticas, se aplicaron los supuestos de normalidad. El tiempo de aparición de síntomas, se comportó como una variable normal y el análisis de la varianza fue hecho a través del Modelo Lineal General (GLM) utilizando un diseño estadístico completamente al azar y como tratamiento la especie de planta. Posteriormente, para su análisis, se utilizó el GLM con un diseño factorial de 2 x 10 (condición de moscas x especie de planta) completamente al azar para un total de 20 tratamientos. Las comparaciones de medias fueron hechas usando la Prueba de Mínimos Cuadrados (LSMEANS) para la interacción, condición de mosca x especie de planta. La significancia para las comparaciones, fue fijada al 5% ($P < 0,05$).

Como el porcentaje de plantas sintomáticas, no tuvo un comportamiento normal, se hicieron varias transformaciones, adaptándola a la normalidad con la función raíz cuadrada más uno ($\sqrt{x+1}$). Para análisis de esta variable se utilizó un ANOVA y las comparaciones de media fueron realizadas con la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Detección de TYLCV en plantas fuentes del virus y en moscas blancas usadas en los ensayos de transmisión

La detección del virus por PCR utilizando la pareja de iniciadores AV494-AC1048 resultó positiva para las muestras de las plantas usadas como plantas fuentes del begomovirus, observándose el fragmento de tamaño esperado de 550 pb aproximadamente, mientras que las muestras tomadas de plantas de algodón usadas como control negativo, en las cuales se mantiene la colonia de moscas blancas no virulíferas, no mostraron dichas bandas, lo que demuestra que no estaban infectadas con begomovirus (Figura 10). En ningún caso se detectó producto de amplificación en los controles de plantas sobre los que no se habían dispuesto moscas virulíferas.

La secuencia obtenida a partir del fragmento amplificado de las muestras obtenidas de las plantas infectadas por este virus mantenidas en el laboratorio, fue recientemente depositada en el banco de genes (GenBank, siglas en inglés), con el número de registro JX025074 (Chirinos *et al.*, 2012). Además el producto de PCR amplificado de la planta fuente del virus empleada en este estudio con los cebadores específicos para 850 pb ya señalados fue secuenciado directamente y su secuencia nucleotídica mostró un 99% de identidad con la secuencia equivalente del aislado de TYLCV-MIId previamente descrito en Portugal (GenBank, número de acceso: AF105975) al igual que el aislado descrito por primera vez en Venezuela (Zambrano *et al.*, 2007).

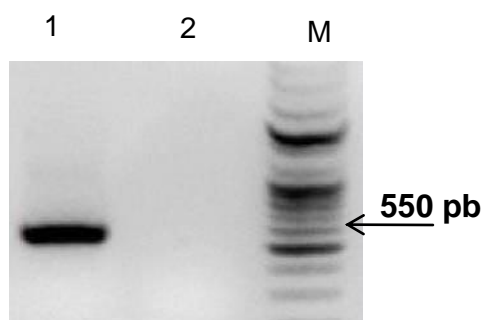


Figura 10. Diagnostico por PCR de la presencia de ADN viral en: 1. Plantas de tomate fuentes de TYLCV y 2. Plantas de algodón, utilizadas para los ensayos de transmisión mediante *B. tabaci*. M: Marcador 1Kb plus;. La flecha indica el fragmento de 550 pb.

Por otro lado, la amplificación obtenida mediante PCR utilizando los mismos iniciadores previamente indicados, también permitió la detección de ADN viral en las moscas virulíferas que fueron utilizadas en los ensayos de transmisión, resultado que contrastó con lo observado para aquellas utilizadas como control negativo donde no se vio la presencia de ADN viral (Figura 11).

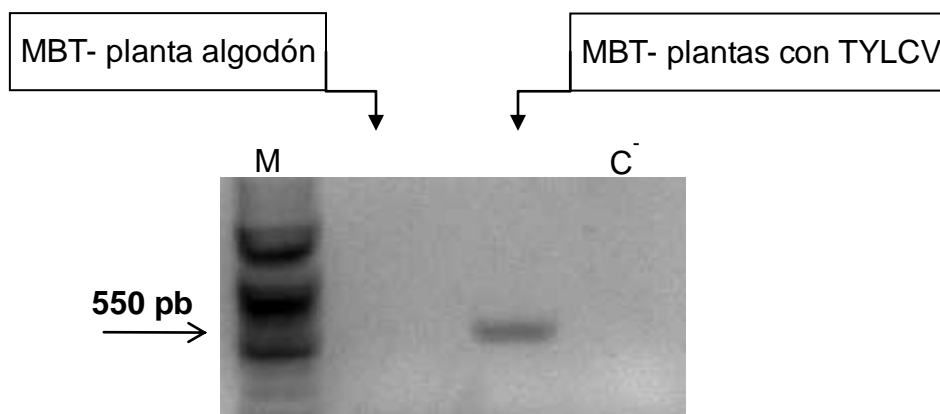


Figura 11. Detección mediante PCR de TYLCV en adultos de *Bemisa tabaci* mantenidos sobre las plantas tomate fuente del virus y sobre plantas de algodón. M: Marcador molecular. La flecha indica el fragmento de 550 pb, C⁻: Control negativo.

3.3.2 Especies susceptibles y aparición de síntomas

De las diez especies de plantas expuestas a moscas blancas virulíferas sólo cuatro: *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *D. stramonium* y *A. dubius* mostraron síntomas de enfermedad viral (Figuras 12 y 13).

Del mismo modo, solamente se obtuvo amplificación por PCR a partir de tejidos tomados de muestras de las plantas sintomáticas mientras que no se obtuvo amplificación en ninguno de los casos de las muestras tomadas de las especies que no mostraron síntomas (Figura 14). En contraste, todas las especies de plantas inoculadas con moscas blancas no virulíferas (testigos) no presentaron síntomas, ni se detectó ADN viral.

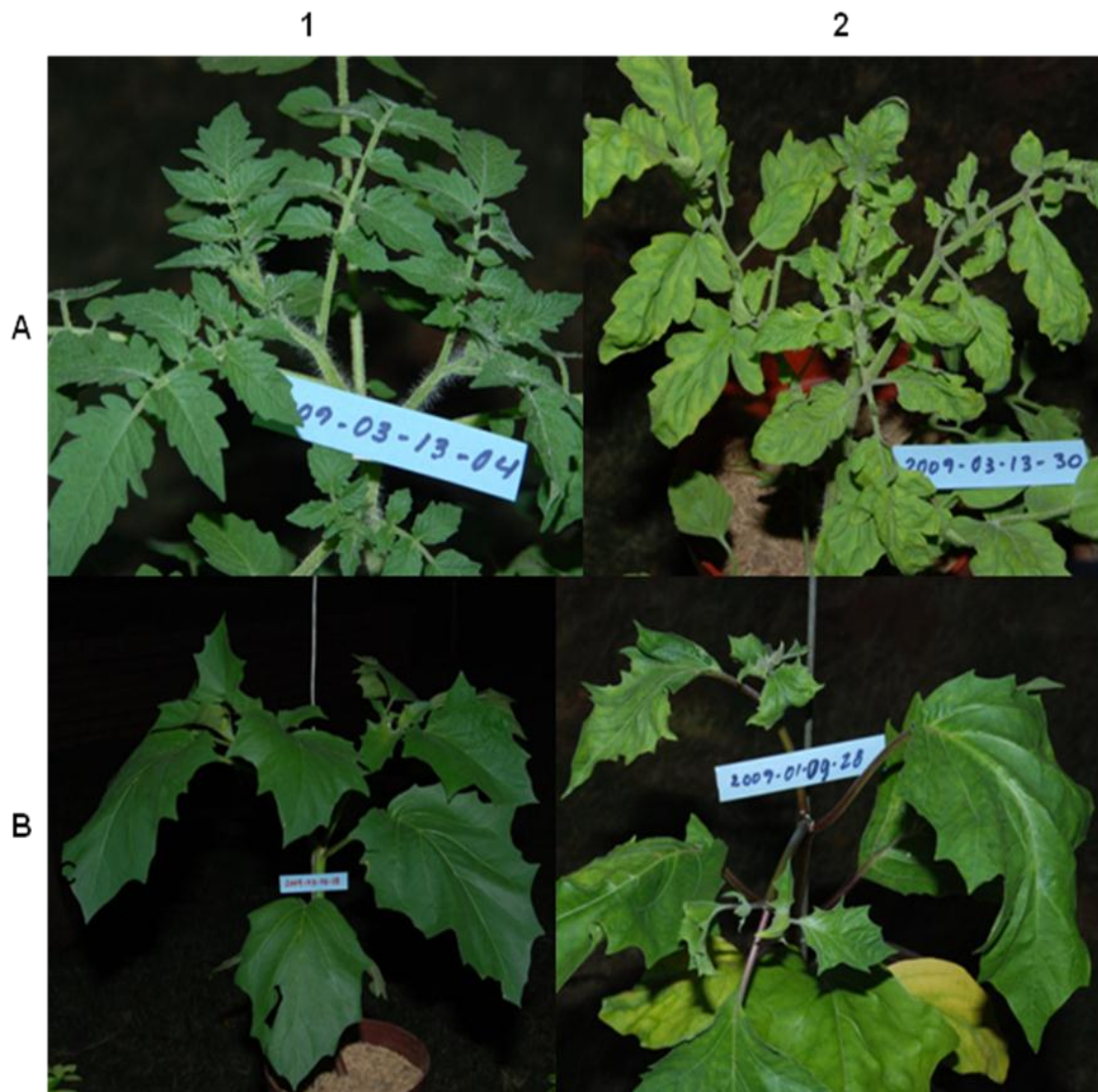


Figura 12. Especies de plantas evaluadas. **A.** *Solanum lycopersicon* y **B.** *Datura stramonium*, expuestas a **1.** Adultos de *Bemisia tabaci* no virulíferos y **2.** Adultos de *B. tabaci* virulíferos

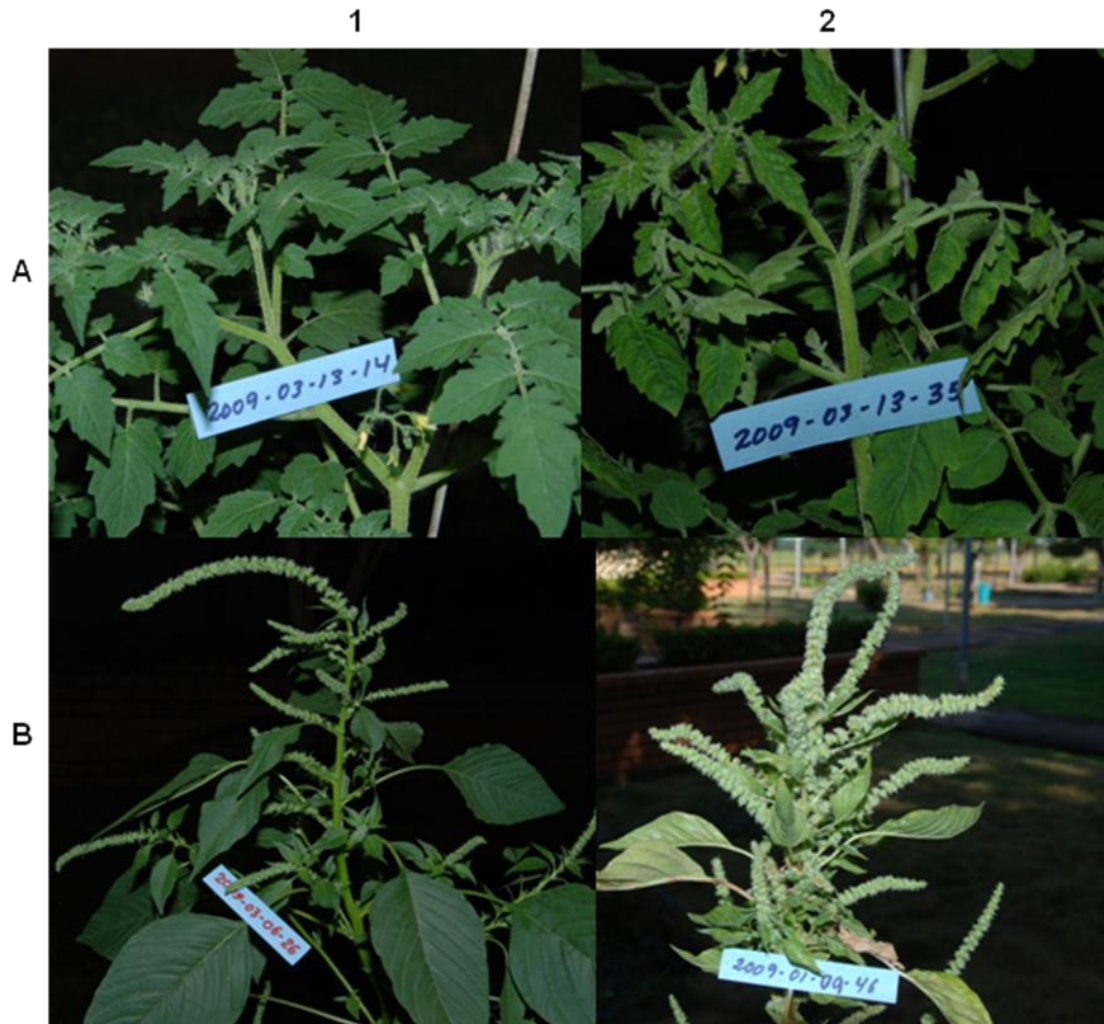


Figura 13. Especies de plantas evaluadas. **A.** *Solanum pimpinellifolium* y **B.** *Amaranthus dubius*, expuestas a **1.** Adultos de *Bemisia tabaci* no virulíferos y **2.** Adultos de *B. tabaci* virulíferos.

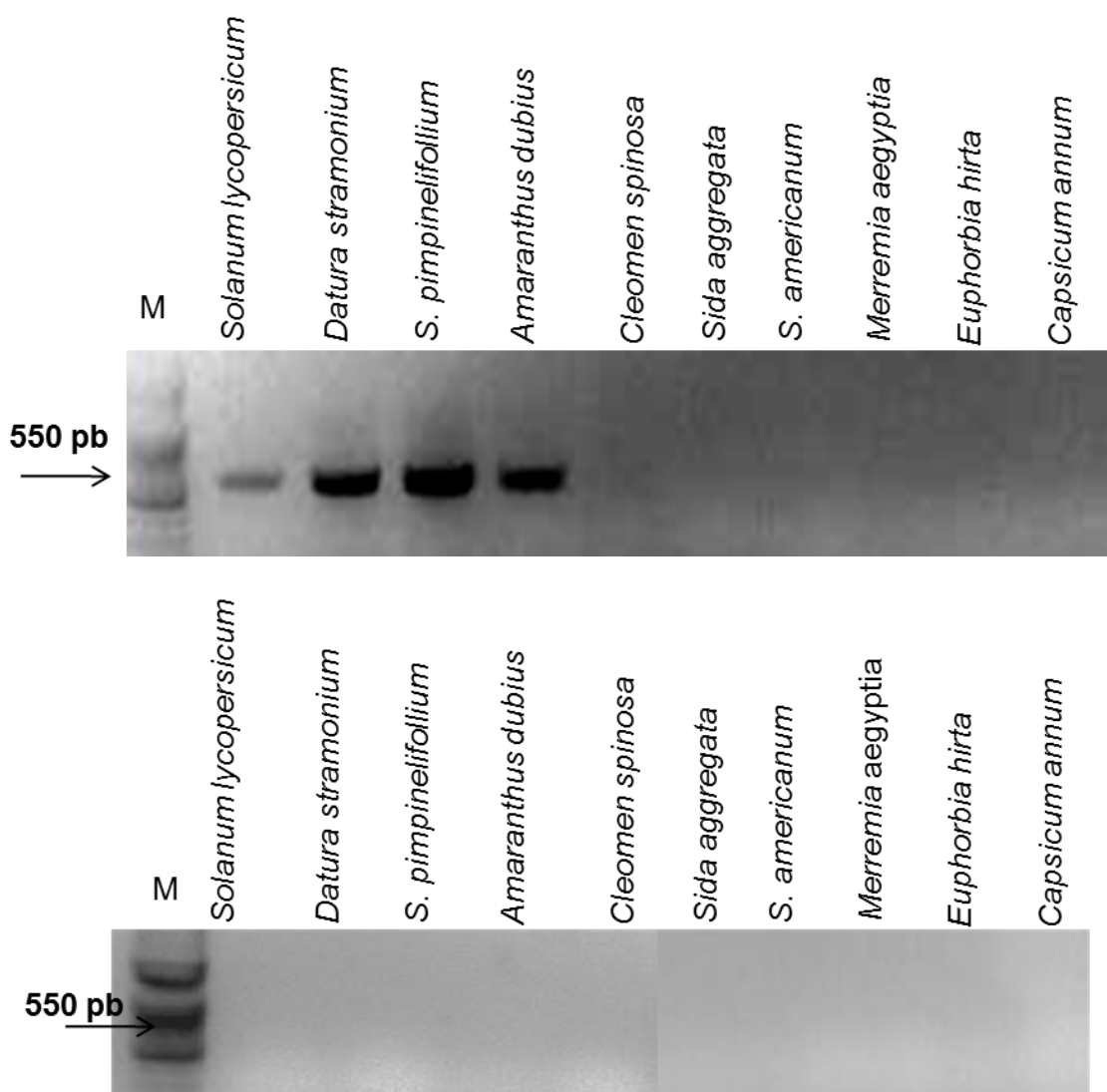


Figura 14. Detección mediante PCR de TYLCV en las diferentes especies de plantas experimentales. En el panel superior se muestran los resultados de los análisis de plantas sometidas a moscas virulíferas y en el panel inferior de plantas sometidas a moscas no virulíferas. Las plantas se analizaron a los 30 días después de la inoculación. M: Marcador molecular. La flecha indica el fragmento de 550 pb.

El porcentaje de plantas que mostraron síntomas, resultó muy inferior en *S. pimpinellifolium* (63,3%), seguido de *A. dubius* (83,3%), mientras que *S. lycopersicum* y *D. stramonium*, mostraron síntomas en todas las plantas evaluadas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de plantas con síntomas de TYLCV como resultado de la transmisión por *Bemisia tabaci* a plantas de cada especie evaluada expuestas por separado a individuos virulíferos y no virulíferos (testigos).

Especies de plantas Evaluadas	Condición	Plantas evaluadas	Plantas sintomáticas ^a		PCR ^b
			No.	Porcentaje	
<i>Solanum lycopersicum</i>	Moscas virulíferas	29	29	100 a	+
<i>Datura stramonium</i>		30	30	100 a	+
<i>S. pimpinellifolium</i>		27	17	63,3± 5,7 b	+
<i>Amaranthus dubius</i>		30	25	83,3± 15,2 ab	+
<i>Cleome spinosa</i>		30	0	0 c	-
<i>Sida aggregata</i>		30	0	0 c	-
<i>S. americanum</i>		30	0	0 c	-
<i>Merremia aegyptia</i>		20	0	0 c	-
<i>Euphorbia hirta</i>		20	0	0 c	
<i>Capsicum annum</i>		20	0	0 c	-
<i>Solanum lycopersicum</i>	Moscas no virulíferas (Testigo)	15	0	0 c	-
<i>Datura stramonium</i>		15	0	0 c	-
<i>S. pimpinellifolium</i>		15	0	0 c	-
<i>Amaranthus dubius</i>		15	0	0 c	-
<i>Cleome spinosa</i>		15	0	0 c	-
<i>Sida aggregata.</i>		15	0	0 c	-
<i>S. americanum</i>		15	0	0 c	-
<i>Merremia aegyptia</i>		15	0	0 c	-
<i>Euphorbia hirta</i>		15	0	0 c	-
<i>Capsicum annum</i>	15	0	0 c	-	

^a R²=0,96; CV=23,1. F: 303,5; P<0,01. Medias ± desviación estándar. Medias con igual letra no difieren significativamente según comparaciones de medias hechas con la prueba de Mínimos Cuadrados (P<0,05).

^b +: especie positiva a TYLCV-Mld; -: especie negativa aTYLCV-Mld.

La observación de síntomas estuvo asociada a la presencia de ADN viral, para el caso de *S. pimpinellifolium* y de *A. dubius*, las muestras seleccionadas al azar para la PCR provenientes de plantas asintomáticas, resultaron negativas al virus. Cabe destacar que plantas de las mismas especies expuestas a moscas blancas no virulíferas, no presentaron síntomas ni se encontró ADN viral a través de la PCR.

Por otro lado, dado que las especies: *Sida aggregata*, *Euphorbia hirta*, *S. americanum*, *Merremia aegyptia* y *Capsicum annuum* fueron asintomáticas y sus muestras compuestas no mostraron ADN viral por PCR (Figuras 14), no fue necesario analizar las muestras individuales que fueron tomadas, ni las muestras previas de las plantas que fueron colectadas en campo para estos ensayos de transmisión en el caso de plantas que no se iniciaron por semilla..

En cuanto al día promedio de aparición de síntomas, en las condiciones empleadas, *S. lycopersicum* fue la especie que los mostró más temprano (9,3 días), seguido de *A. dubius* (11,3 días), mientras que *D. stramonium* y *S. pimpinellifolium* mostraron los síntomas después de 12 dpi (Cuadro 8).

Cuadro 8. Promedio del tiempo de aparición en días de los síntomas de TYLCV, para especies de plantas expuestas a adultos virulíferos de *B. tabaci*

Especies de plantas	Tiempo de aparición de síntomas (días) ^a
<i>Solanum lycopersicum</i>	9,3 ± 0,8 c
<i>Datura stramonium</i>	12,3 ± 1,4 a
<i>S. pimpinellifolium</i>	12,2 ± 1,6 a
<i>Amaranthus dubius</i>	11,0 ± 1,3 b

^a R²=0,70; CV=10,3; F=28,9. P<0,01. Medias ± desviación estándar. Medias con igual letra no difieren significativamente. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Mínimos Cuadrados (P<0,05).

3.3.3 Identidad del Begomovirus

Los productos de PCR obtenidos para la planta fuente, moscas virulíferas y las plantas sintomáticas a las que se les transmitió el virus, así como, de las retransmisiones a tomate (ver más adelante), fueron purificados y secuenciados, al compararse con las secuencias disponibles en el banco de genes a través del Programa Blast mostraron un porcentaje de secuencia nucleotídica del 99%, con la secuencia correspondiente del aislado de TYLCV-Mld que fue previamente reportado en Venezuela (Zambrano *et al.* 2007). Esto corrobora, molecularmente, que el begomovirus existente en las plantas fuentes del virus mantenidas en el laboratorio de la UTF era TYLCV-Mld y que fue transmitido con éxito a las plantas experimentales a través de las moscas virulíferas utilizadas y luego recuperado con la retransmisión de especies infectadas a tomate.

3.3.4 Síntomas observados

La manifestación de los síntomas varió de acuerdo a la especie de la planta. En *S. lycopersicum*, los síntomas se caracterizaron por acortamiento de los entrenudos apicales, encrespado y acopado de las hojas terminales y amarillamiento acentuado hacia los bordes (Figura 15), manifestaciones típicas de TYLCV en plantas de tomate, las cuales coinciden con lo observado por Chirinos *et al.* (2009), quienes utilizaron la misma cepa del virus. Con relación a *D. stramonium*, las hojas tendían a ondularse mostrando también amarillamiento intervenal algo difuso, contrastante con la superficie plana y el color verde uniforme de las plantas sanas de esta especie (Figura 16). Estos síntomas coinciden con lo reportado previamente para la misma cepa del virus, (Chirinos *et al.* 2009). Similares síntomas a los de *S. lycopersicum* fueron observados en *S. pimpinellifolium*, no obstante, en esta última especie también se observó un acentuado acopamiento de la hoja (Figura 17).

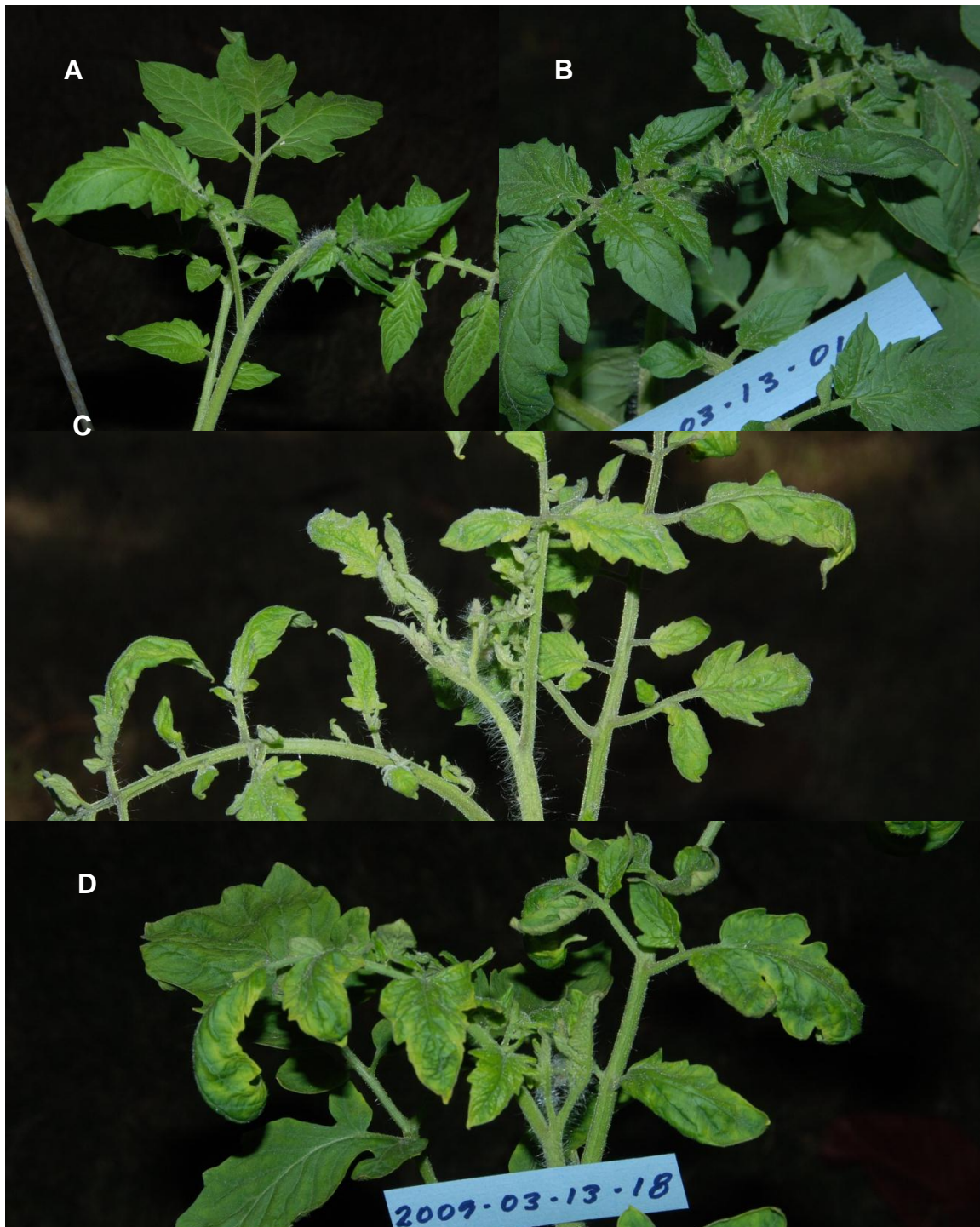


Figura 15. Síntomas asociados con transmisión de TYLCV, observados en plantas de *Solanum lycopersicum* durante la evaluación. A y B: plantas sanas; C y D plantas enfermas.

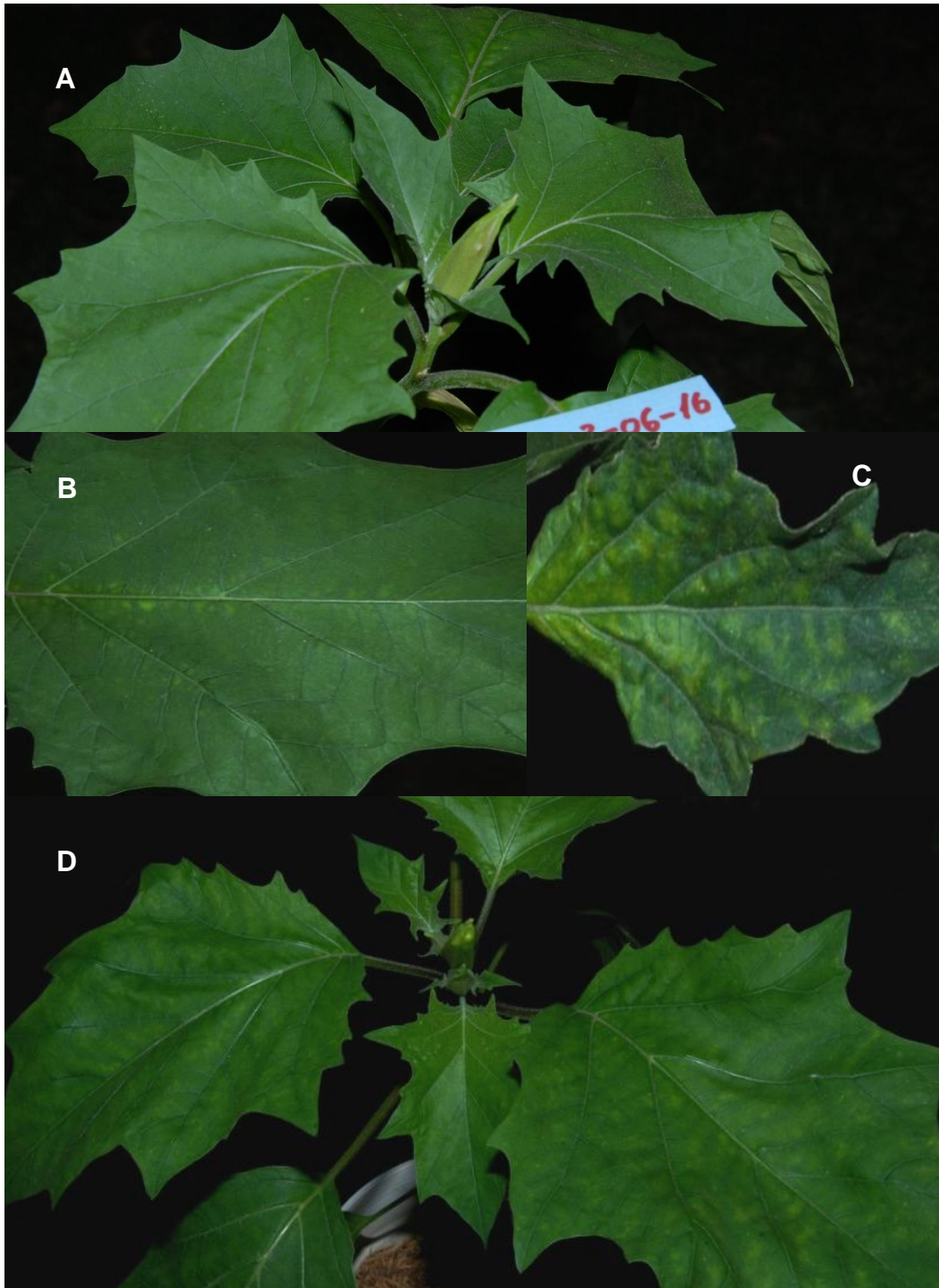


Figura 16. Síntomas asociados con transmisión de TYLCV, observados en plantas de *Datura stramonium* durante la evaluación. A: planta sana; B, C y D plantas enfermas.

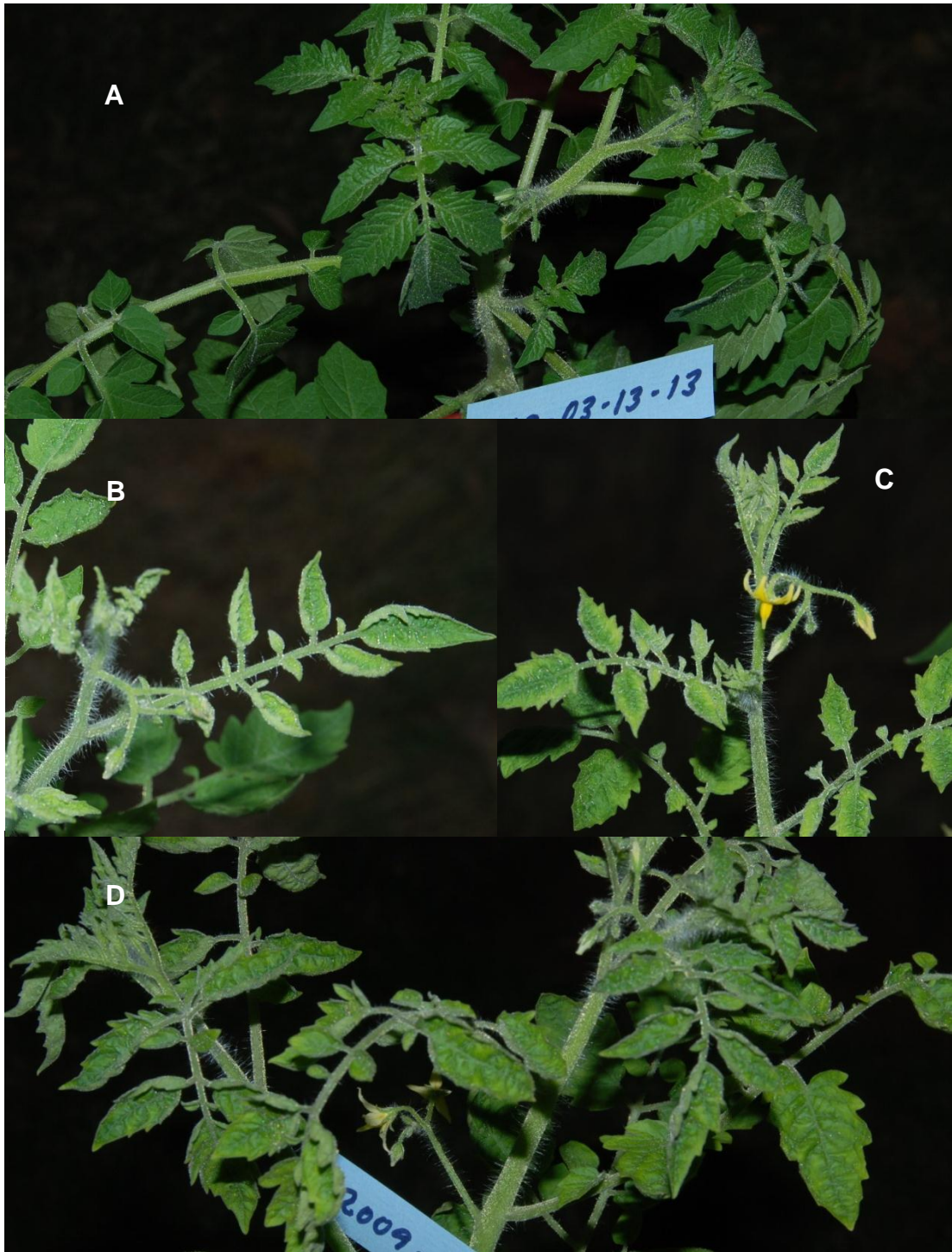


Figura 17. Síntomas asociados con transmisión de TYLCV, observados en plantas de *Solanum pimpinellifolium* durante la evaluación. A: planta sana; B, C y D plantas enfermas.



Figura 18. Síntomas asociados con transmisión de TYLCV, observados en plantas de *Amaranthus dibiis* durante la evaluación. A: planta sana; B, C y D plantas enfermas.

El caso de *A. dubius* resultó particular ya que los síntomas no se manifestaron con clorosis de hojas, sino con un leve acopamiento y disminución de la lámina foliar, combinado con abundante proliferación de las inflorescencias (Figura 18).

3.3.5. Retransmisión de TYLCV a *Solanum lycopersicum*

De las plantas que resultaron sintomáticas a TYLCV utilizadas para retransmitir el virus a tomate, se logró transmisión aunque con variaciones significativas en el porcentaje de infección que resultó inferior con *S. pimpinellifolium* y *D. stramonium*, con 79% y 88%, respectivamente, mientras que las moscas que provinieron de *A. dubius* infectaron alrededor del 95% de las plantas de tomate (Cuadro 9). Con relación al tiempo promedio de aparición de síntomas, aunque se detectaron diferencias estadísticas, resultando inferior en *D. stramonium*, esta diferencia fue de un día aproximadamente (Cuadro 10). La presencia de virus en las plantas sintomáticas de tomate fue corroborada por PCR al detectar ADN viral en las muestras tomadas de las plantas de tomate evaluadas (Figura 19).

Cuadro 9. Porcentaje de plantas de tomate con síntomas de inoculadas mediante *B. tabaci*, a partir de plantas sintomáticas de *Solanum lycopersicum*, *Datura stramonium*, *S. pimpinellifolium* y *Amaranthus dubius*.^a

Especies sobre la que se adquirió TYLCV-Mld para la inoculación de plantas de tomate	Número de plantas de tomate evaluadas	Número de plantas de tomate sintomáticas	Porcentaje de plantas de tomate sintomáticas
<i>Solanum lycopersicum</i>	20	20	100,0 a
<i>Amaranthus dubius</i>	13	12	95,0 ± 8,8 b
<i>Datura stramonium</i>	19	17	88,0 ± 12,5 b
<i>S. pimpinellifolium</i>	21	16	79,0 ± 9,6 bc

^a R²: 0,71; CV = 9,6; F: 38,2; Pr > F = 0,01, Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Mínimos Cuadrados (P<0,05). Medias con igual letra no difieren significativamente.

Cuadro 10. Promedio del tiempo de aparición (días) de síntomas en plantas de tomate inoculadas con adultos de *Bemisia tabaci* que adquirieron durante 48 horas el virus en especies de plantas que presentaron síntomas.

Especies de plantas usadas en la retransmisión a tomate	Día de aparición de síntomas
<i>Solanum lycopersicum</i>	9,4 ± 0,6 c
<i>Datura stramonium</i>	10,1 ± 0,7 b
<i>S. pimpinellifolium</i>	11,1 ± 1,3 a
<i>Amaranthus dubius</i>	11,0 ± 0,7 a

$R^2 = 0,67$; $CV = 6,7$; $F = 5,7$ $P < F: 0,01$. Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Mínimos Cuadrados ($P < 0,05$). Medias con igual letra no difieren significativamente.

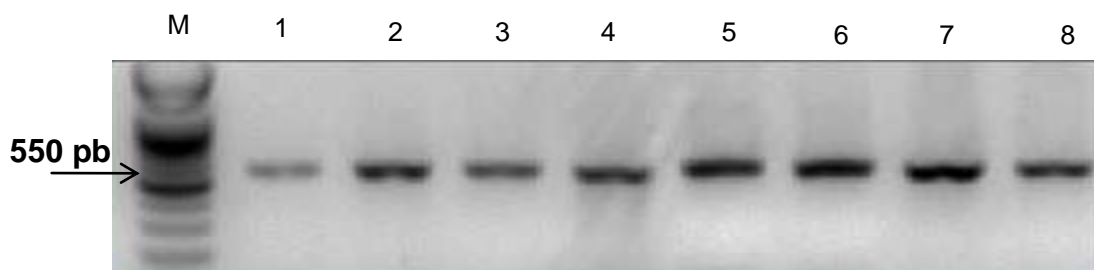


Figura 19. Detección mediante PCR de *Begomovirus* detectadas en plantas de tomate retransmitidas a partir de 1 y 2 *Solanum lycopersicum*; 3 y 4 *S. pimpinellifolium*; 5 y 6 *Datura stramonium*; 7 y 8 *Amaranthus dubius*; La flecha indica el fragmento de 550 pb

DISCUSIÓN

Tal como se puede deducir, durante este estudio, resultaron no hospedaras del TYLCV-Mld, las especies de plantas, *C. annuum*, *S. americanum*, *C. spinosa*, *Sida aggregata*, *Merremia aegyptia* y *E. hirta*, lo que se discutirá a continuación. En el caso de *C. annuum*, lo obtenido difiere de lo señalado por Polston *et al.* (2006), quienes también evaluaron la infección con esta misma cepa del TYLCV mediante *B. tabaci* a 55 genotipos de *C. annuum*, incluyendo el pimentón Californina Wonder empleado en este estudio y utilizando unas 50 moscas virulíferas por planta y logrando con esto hasta 100% infección. Es posible que la diferencia estribe en la cantidad de adultos utilizados, en este ensayo, tal como se refirió en la metodología fueron 25 por planta, es decir la mitad de los adultos utilizados por Polston *et al.* (2006). En este sentido, es importante señalar que en laboratorios de UTF se ha tratado de establecer colonias de *B. tabaci* sobre esta especie de solanácea cultivada y solo utilizando fuertes presiones poblacionales del insecto se han podido obtener colonias sobre la misma (información no publicada). En el trabajo de estos investigadores se puso de manifiesto que solamente un 50% (30 de 55) de los genotipos de *C. annuum* evaluados fueron susceptibles de ser infectados.

La no infección de *S. americanum*, a pesar de la cantidad de adultos virulíferos de *B. tabaci* utilizados en los estudios de transmisión, contrasta con el hecho que su homólogo para el viejo Mundo, *S. nigrum*, constituya un reservorio de TYLCV en España (Sánchez-Campos *et al.* 1999; Jordá *et al.* 2001). Sin embargo, debe destacarse que García-Andrés *et al.* (2006) señalan que la acumulación sistémica de TYLCV-IL en *S. nigrum* es deficiente, solamente detectable por PCR, mientras que Monci *et al.* (2002) no detectaron acumulación sistémica de TYLCV-Mld en este huésped por hibridación molecular. Por lo tanto, parece que *S. nigrum* no es un buen huésped de TYLCV, de forma similar a lo observado aquí para *S. americanum*.

La no infección de *C. spinosa*, podría explicarse, además de por la posible no susceptibilidad, por la presencia observada en las hojas, de tricomas glandulares que

producen sustancias pegajosas donde los adultos de *B. tabaci*, pudieron haber quedado atrapados. Esta situación fue detectada en un estudio anterior para *S. sisymbriifolium* al ser inoculado con este mismo virus, y cuya planta posee una alta densidad de pequeños tricomas glandulares distribuidos sobre toda su superficie y que exudan sustancias pegajosas donde los individuos de *B. tabaci* quedaron atrapados (Chirinos *et al.*, 2009). Aunque *Sida aggregata* y *E. hirta* son hospederas de *B. tabaci* en Venezuela (Arnal *et al.*, 1993) no se logró transmitir el virus, lo que coincide con lo referido por Zenthu y Davis (2000) en un estudio de campo realizado al sur de Florida. Por otro lado, varias especies de *Merremia* pueden hospedar diversos begomovirus, entre los que resalta el *Merremia mosaic virus* (Número de accesión AB690900), sin embargo hasta ahora no ha sido encontrada como hospedera de TYLCV.

Los resultados encontrados para *D. stramonium* muestran que se comportó como un hospedero experimental sintomático que podría constituir un potencial reservorio del virus en el campo. De forma similar, Sánchez-Campos *et al.* (1999) también observaron que este huésped podía ser un buen reservorio tanto de TYLCV como de otro begomovirus similar a él, Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) en las epidemias que se producen en España. Los datos aquí obtenidos confirman los resultados arrojados en estudios anteriores (Chirinos *et al.*, 2009). Sin embargo, adicionalmente a ese estudio, aquí se realizaron ensayos de retransmisión hacia tomate lo que reafirma esa condición de hospedero alternativo para infecciones posteriores de tomate. Resultados similares han sido reportados para otros países, tanto en observaciones de campo como en laboratorio (Ramos *et al.*, 1996; Kashina *et al.*, 2002; Salati *et al.*, 2002; De Blas *et al.*, 2004; Sawalha, 2009). Igualmente, utilizando la técnica de biobalística, con TYLCV clonado en plásmido bacterial se ha logrado la inoculación de TYLCV a plantas de *S. lycopersicum* y *D. stramonium*, (Lapidot *et al.*, 2007), así mismo se ha logrado por medio de inoculaciones utilizando *Agrobacterium tumefaciens* para begomovirus similares a TYLCV (Behjatnia *et al.*, 2009).

La especie, *S. pimpinellifolium* es capaz de ser infectada y actuar como fuente de inóculo de TYLCV-Mld mediante *B. tabaci*, lo que lo convierte también en un hospedero

alternativo de este virus además de que coincide con lo obtenido para ese virus en estudios previos de laboratorio (información no publicada). Asimismo, Debrot y Centeno (1985) habían observado en campo plantas de crecimiento espontáneo, como, *S. pimpinellifolium* con sintomatologías asociadas a afecciones virales en parcelas de tomate. Cabe resaltar que con esta especie fue con la que se obtuvo el menor porcentaje de plantas sintomáticas/infectadas tanto en la transmisión como en la retransmisión. Igualmente en la investigación de laboratorio arriba referida, donde se realizó la transmisión experimental a *S. lycopersicum* y a *S. pimpinellifolium*, en esta última solo se logró la transmisión del virus mediante *B. tabaci* al 40% de las plantas inoculadas. La baja infección lograda, probablemente este asociada a la resistencia de la planta debido a la presencia de los tricomas y pubescencia que interfieren con la alimentación y establecimiento del vector, lo que recientemente está siendo utilizado para mejoramiento genético como fuente de resistencia ante este mismo virus (Rodríguez-López *et al.*, 2011).

3.3.6 El caso particular de *Amaranthus dubius*.

El hallazgo más interesante de la presente investigación, lo constituye la detección de *A. dubius* como potencial hospedero de TYLCV cuya presencia en plantas sintomáticas fue corroborado por PCR con los cebadores de 550 pb (Figura 14) además con los referidos cebadores específicos diseñados por King *et al.* (2006). Los productos de PCR fueron amplificados y su secuencia nucleotídica (GenBank Accession No. JN182213), al igual que para las plantas fuentes fue 99% coincidió con el aislado de TYLCV-Mld ya señalado (Zambrano *et al.*, 2007). Dado que el gen de la CP es conservado entre razas de TYLCV, el tercer par de cebadores diseñados por Lefeuvre *et al.* (2007), amplificó para el fragmento esperado de 500 pb, el cual fue obtenido y secuenciado en ambas direcciones y cuya secuencia viral también fue depositada en el banco de genes quedando registrado con el número de accesión No. JQ738375.

Las comparaciones de secuencias con las razas de TYLCV disponibles en el GenBank reveló 99% de identidad nucleotídica con algunos aislados de TYLCV-Mld (Ejemplo: TYLCV-Mld-[Portugal], N° accession: AF105975, TYLCV-Mld-[Spain7297], N° accession: AF071228, TYLCV-Mld-[Israel], N° accession: X76319). En contraste las identidades con secuencias nucleotídicas de otras cepas de TYLCV fueron menores a 92%.

La presencia de infecciones por TYLCV en *A. dubius* fue reafirmada tanto mediante retransmisión hacia plantas de tomate, así como por un análisis de detección de Southern blot que demostró acumulación a niveles significativos, con presencia de formas replicativas del virus en las plantas infectadas (Figura 20). Hasta donde se tiene conocimiento, este constituye el primer reporte de esta especie de *Amaranthus dubius* como hospedero de este virus. Esta especie ya había sido reportada en Cuba como maleza hospedante de *Bean golden mosaic virus* (BGMV), cuyas muestras fueron analizadas mediante la técnica de microscopía óptica para detectar las inclusiones nucleares producidas por este geminivirus (Romero *et al.*, 2002). Asimismo, en un exhaustivo estudio hecho en Chipre, otras especies de *Amaranthus* han sido encontradas como hospederos naturales de TYLCV (Papayiannis *et al.*, 2011).

3.3.7 Consideraciones finales

Es importante recalcar que las especies *S. pimpinellifolium*, *A. dubius* y *D. stramonium*, son malezas que se desarrollan agroecológicamente bien en muchas regiones de Venezuela, principalmente en las regiones costeras (Schnee, 1984). Por tanto, con base a los resultados obtenidos en este trabajo las cataloga como hospederas potenciales de TYLCV y, en consecuencia podrían constituir posibles eslabones en la epidemiología de este virus.

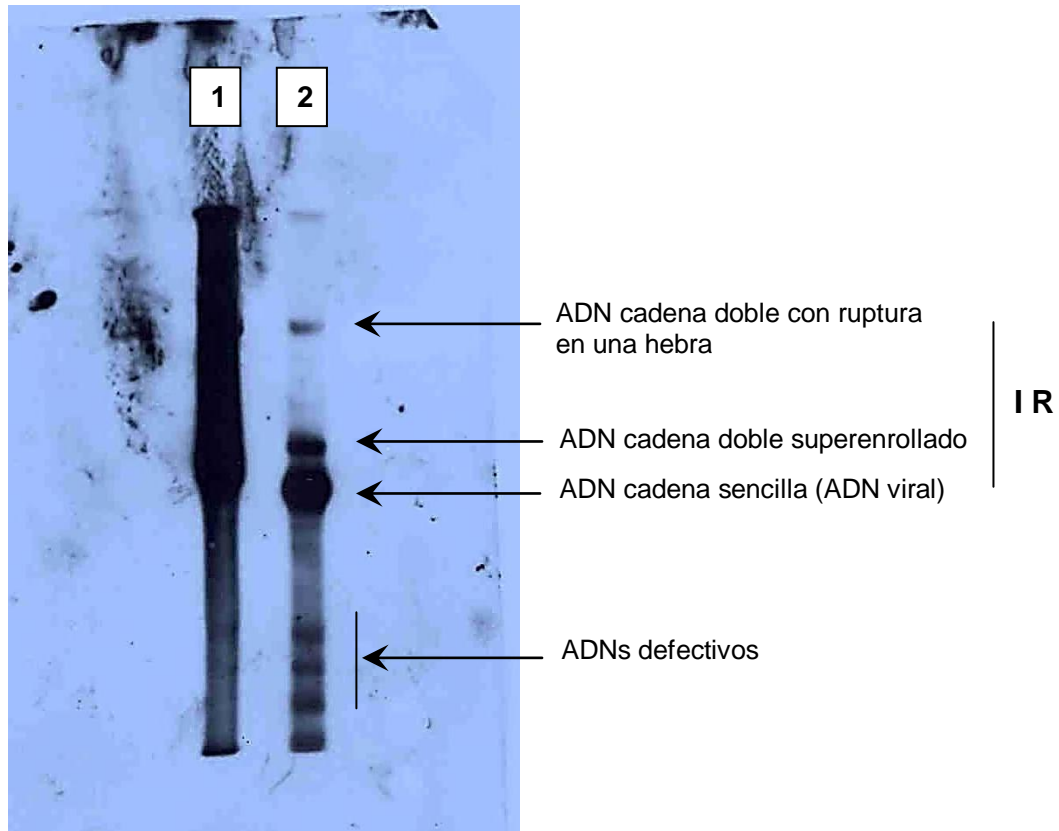


Figura 20. Determinación de la presencia de estados replicativos del TYLCV en plantas de *Amaranthus dubius* mediante prueba de Southern blot utilizando sondas de hibridación específicas. 1: TYLCV-Mld control; 2: TYLCV-Mld en plantas de *Amaranthus dubius* transmitido desde plantas de tomate infectadas. I R: Intermediarios Replicativos.

CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS EN GENOTIPOS COMERCIALES DE TOMATE

4.1 Introducción

El desarrollo y uso de variedades resistentes es señalada como una de las mejores alternativas para el control de los begomovirus (Moriones y Navas-Castillo 2000). Por ello se ha generado la necesidad de evaluar el comportamiento de cultivares desarrollados para la resistencia contra éstos (Pérez de Castro *et al.*, 2008) frente a los begomovirus presentes en la zona objeto de estudio, y sobre todo con materiales que se adapten a las condiciones tropicales (Gómez *et al.*, 2008) ya que el mejoramiento genético del tomate se ha llevado a cabo en zonas templadas (Morales y Anderson, 2001). En el caso de no encontrar cultivares con un comportamiento adecuado, será necesario iniciar procesos de búsqueda de resistencia/tolerancia en genotipos silvestres que posteriormente puedan ser introgresadas en los genotipos cultivados mediante procesos de mejora.

En este sentido, varios han sido los trabajos realizados para evaluar la resistencia de genotipos mejorados ante el begomovirus monopartito TYLCV:

Lapidot *et al.* (1997) compararon la resistencia de TYLCV entre cultivares de tomate, evaluando el desarrollo de los síntomas y la acumulación del virus. Fue detectada la presencia de ADN viral sobre las hojas de las plantas en campo a través la prueba del método de hibridación dot blot. Los parámetros evaluados fueron rendimiento, número de frutos, peso promedio de los frutos y peso fresco de las plantas. En las líneas evaluadas se manifestaron diferencias de resistencia al virus correlacionado con el rendimiento de las mismas. Los cultivares comerciales tuvieron pérdidas significativas del peso fresco de la planta comparado con las plantas no inoculadas. Además varios cultivares comerciales y líneas mejoradas inhibieron el efecto del virus.

Lapidot *et al.* (2001) evaluaron cuatro cultivares de tomate con diferentes niveles de resistencia al TYLCV transmitido mediante *B. tabaci*. Estos investigadores, observaron poca acumulación del ADN viral en plantas con alta resistencia, comparadas con las plantas susceptibles al virus. A su vez, Lapidot *et al.*, (2006) desarrollaron una escala para evaluar los niveles de resistencia al TYLCV en plantas de tomate. La escala fue compuesta por siete genotipos de tomate que presentaban varios niveles de resistencia al TYLCV, los cuales se evaluaron en diferentes condiciones ambientales y diferentes edades de inoculación de la planta. La gravedad de los síntomas de cada genotipo evaluado varió bajo las diferentes condiciones ambientales en estudio. Los autores observaron que en cuatro semanas se puede determinar la resistencia relativa de los genotipos evaluados.

Geraud *et al.* (2009) evaluaron el comportamiento en cuanto a expresión de síntomas y porcentaje de plantas sintomáticas en cuatro genotipos comerciales de tomate inoculados con TYLCV mediante *B. tabaci*. Los genotipos utilizados fueron, variedad Río Grande, híbrido Río Grande, híbrido Río Orinoco e híbrido El Cid, este último, desarrollado como resistente a TYLCV. Los tres primeros resultaron sintomáticos del virus mientras que el último se comportó como asintomático ya que a través de PCR se detectó la presencia de ADN viral en muestras tomadas de plantas de este híbrido que fueron infectadas con adultos de *B. tabaci* portadores del virus.

Actualmente, varios genotipos de tomate han sido mejorados por su resistencia al TYLCV y otros begomovirus del Viejo Mundo. No obstante, en América Latina estos materiales están siendo promocionados como “resistentes” a cualquier begomovirus, sean del Viejo o Nuevo Mundo. Es necesario que se genere información ya que los virus del Nuevo Mundo son bipartitos y pueden mostrar diferencias de comportamiento. De esta manera es necesario mejorar genotipos para que resistan a estos últimos tipos de virus, y por otro lado, evaluar la resistencia de los ya existentes, para descartar aquellos que se comporten susceptibles ante los bipartitos y utilizar los que resultasen resistentes ante éstos. Dentro de este orden de ideas, varias líneas y genotipos han sido evaluados, tal como se refiere:

Piven y De Uzcátegui (1995) evaluaron la resistencia de varias especies de *Lycopersicon* contra el ToYMV, tales como *L. chilense* (LA1963, LA1969 y LA2548), *L. hirsutum* (LA1353 y LA1223), *L. peruvianum* var. *Glandulosum* (LA1292) y *L. esculentum* (Marglobe y Río Grande) entre otras, en condiciones de campo y de umbráculo. El virus fue inoculado de forma mecánica y mediante el vector *B. tabaci*. Se observó el desarrollo de los síntomas, el cual varió en cada una de las líneas estudiadas. Al transmitir el virus con el vector los síntomas fueron más severos. Usaron la técnica PCR para la detección molecular del virus y observaron resistencia al ToYMV en entradas de las especies *L. chilense* y *L. peruvianum* var. *glandulosum*.

Infante *et al.* (1996) evaluaron la resistencia de algunas solanáceas contra el ToYMV y la presencia de ADN viral en estas especies, en condiciones de umbráculo y campo. Las especies evaluadas fueron: *L. esculentum*, *L. peruvianum*, *Lycium barbarum*, *Nicotiana benthamiana*, *S. lycopersicoides*, *S. quitoense* y *S. ricky*. Las inoculaciones del virus se realizaron a través del vector y mecánicamente. Se utilizó la técnica de PCR para detectar la presencia de ADN viral y encontraron que las plantas *L. barbarum* and *S. lycopersicoides* no contenían ADN viral presentando resistencia al ToYMV.

Giordano *et al.* (2005) demostraron que la líneas "TX 468-RG" de tomate es una de las mejores fuentes de resistencia a un amplio complejo de begomovirus bipartitos en Brasil. Por tanto, a partir de la misma, luego de una serie de cruces y retrocruces obtuvieron variedades mejoradas las cuales fueron expuestas a moscas virulíferas demostrando la resistencia a varios begomovirus bipartitos que infectan tomate en ese país.

Boissot *et al.* (2008) evaluaron nueve accesiones (líneas) de *Solanum pimpinelifolium* para su resistencia a PYMV mediante inoculación a través del vector *B. tabaci*, biotipo B así como por injerto. Inocularon las plantas con 50 moscas para evaluar los niveles de resistencia. Cuatro de esas líneas que mostraron varios niveles de resistencia fueron inoculadas por injertos con PYMV. Se observó altos niveles de

resistencia al PYMV en *S. pimpinelifolium* LA2187-5 (sin presentar síntomas luego de la inoculación tanto con el vector así como por injerto) y en *S. chilense* LA1969. Pocas plantas de *S. pimpinelifolium* LA1478 fueron infectadas por PYMV después de la inoculación mediante el vector y por injerto.

Fernandez *et al.* (2011) evaluaron la trasmisión del begomovirus bipartito ToVEV mediante *B. tabaci* a los genotipos comerciales de tomate variedad Río Grande, híbrido Río Grande, híbrido Río Orinoco e híbrido El Cid. Todos los cultivares incluyendo El Cid, híbrido comercializado como resistente al TYLCV, resultaron susceptibles ante este bipartito ToVEV. Así, este es un ejemplo de que un híbrido que se comportó como resistente ante TYLCV, el virus para el cual fue mejorado (Geraud *et al.*, 2009), puede resultar extremadamente susceptible ante otro begomovirus como el ToVEV (Fernandez *et al.*, 2011). Esto implica que los mecanismos de resistencias mejorados ante begomovirus monopartitos del Viejo Mundo no implican necesariamente la misma resistencia frente a begomovirus bipartitos del Nuevo Mundo.

Basado en lo anteriormente expuesto, y dado que la cepa Mld de TYLCV no ha sido descrita en otras regiones del Nuevo Mundo, habiéndose detectado solamente en Venezuela (Zambrano *et al.*, 2007) el principal objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento de resistencia/susceptibilidad al begomovirus monopartito TLCV-Mld y al bipartito relacionado con ToVEV y, en su caso, la velocidad de aparición de síntomas y porcentaje de infección de varios genotipos de tomate utilizados en cultivos comerciales de Venezuela utilizando la infección mediante *B. tabaci*. Dado que varios de los cultivares aquí evaluados han sido mejorados para resistencia al TYLCV, se pretende determinar también su comportamiento ante un bipartito también presente en Venezuela, puesto que los genes de resistencia no necesariamente tienen que conferir resistencia a diferentes begomovirus (Gilberston *et al.*, 2011). La información obtenida puede ser esencial para la toma de decisiones sobre qué cultivares recomendar para el cultivo de tomate en diferentes regiones de Venezuela.

4.2 Materiales y métodos

La evaluación de genotipos fue realizada en dos ensayos en dos períodos de tiempo diferentes en los que se incluyeron diferentes genotipos comerciales de tomate. El procedimiento experimental que se siguió para ambos fue el mismo. A continuación se detallan, los genotipos evaluados en cada estudio, el procedimiento experimental y los respectivos análisis moleculares y estadísticos.

4.2.1. Genotipos comerciales evaluados

En el ensayo 1, la fase experimental fue realizada durante el período octubre – diciembre 2008 y se evaluaron dos híbridos de Hazera resistentes a TYLCV: Helena (HA-3228) y Cecile (HA-3229), y la variedad Río Grande (VRG, Petoseed Co. Inc., Saticoy), como control susceptible tanto a TYLCV como al begomovirus tipo ToVEV (Chirinos *et al.* 2012). El segundo ensayo se realizó durante el período mayo – junio 2009 y se utilizaron como genotipos comerciales: tres de Hazera: Shirly (HA-3331), ShanTY (HA-3371) y Tres (HA-3359) cultivares mejorados tolerantes a TYLCV, además se evaluó la variedad Cherry (VCh) (de semillas obtenidas de siembras de campos comerciales en el Zulia), y los híbridos El Cid, Río Grande (HRG), Río Orinoco (HRO), y la variedad Río Grande (VRG), estos cuatro últimos cultivares de Peto Seed®, de los cuales sólo El Cid es resistente al TYLCV, los demás son susceptibles.

Tal como se refirió en el marco teórico, se contaba en dos laboratorios de UTF, LUZ en los cuales se mantenían plantas fuentes del monopartito TYLCV y del bipartito ToVEV. A continuación se describe el procedimiento experimental del ensayo.

4.2.2 Producción de plantas experimentales.

Las semillas de los genotipos comerciales fueron sembradas en bandejas iniciadoras de polietileno de 0,30 x 0,62 m (ancho x largo) con 128 receptáculos, sobre sustrato a base de turba de musgo (Sunshine Plug Mix 5, Sun Gro Horticulture Inc. Bellevue, Washinton, EE.UU.) y mantenidas dentro de jaulas entomológicas, envueltas en una bolsa negra de polietileno hasta que se completaba la germinación. Posteriormente la bolsa era retirada y las plantas en las bandejas eran mantenidas dentro de las jaulas hasta los ensayos de trasmisión. Mientras estuvieron en las bandejas se hicieron tres fertilizaciones (una por semana) con un fertilizante de alta solubilidad Solub® (18-18-18), aplicando 5 cc por planta de la solución preparada a una concentración de 2 g/litro de agua.

4.2.3 Ensayo de transmisión

Para las inoculaciones, 20 días después de la siembra, las plantas fueron colocadas individualmente (con la turba) en potes plásticos (capacidad = 50 cc, dimensiones 5 cm de altura x 3,4 cm de diámetro) y fueron expuestas a moscas blancas recién emergidas (24 h) alimentadas por un periodo de 48h sobre las plantas fuentes de cada uno de los dos virus o sobre algodón (libre de virus). Veinte adultos fueron colocados por planta para cada genotipo (cultivar o híbridos) de tomate analizado. Para ello, se cubrieron con jaulas cilíndricas de plástico transparente (sección de envase de gaseosa de 2 l, 10 cm x 15 cm, diámetro x altura) con el tope cerrado con organza. Los adultos de *B. tabaci* fueron introducidos dentro de la jaula, colocando el tubo de vidrio del succionador con el cual habían sido colectados (de las plantas con virus o de las de algodón) y destapados boca arriba, donde fueron dejados alimentándose sobre la planta por un período de 48 h como período de acceso para la inoculación (PAI), posterior a lo cual, fueron retiradas las jaulas plásticas.

Una vez culminado el PAI, todas las plantas fueron asperjadas con una solución de imidacloprid (Relevo 500) preparada a 0,53 gm i.a./l, para eliminar los adultos de

mosca blanca. En ese momento las plantas fueron trasplantadas a macetas plásticas con aproximadamente 2 kg de suelo (mezcla 2:1 de suelo areno franco con materia vegetal descompuesta). Una vez sembradas, a cada maceta se le aplicó al suelo 10 cc del mismo insecticida, dado que es un producto sistémico que se absorbe por la raíz y cuyo efecto sobre la planta persiste por al menos 30 días, sin dejar desarrollar poblaciones del insecto vector durante ese tiempo (Chirinos *et al.*, 2011). Las macetas fueron pasadas a las jaulas umbráculo ya descritas. Éstas eran regadas a diario y fertilizadas dos veces por semana con 10 cc del mismo fertilizante utilizado en semillero y a la misma concentración.

Las plantas fueron expuestas por separado a moscas virulíferas (con TYLCV o ToVEV) y a moscas no virulíferas totalizando nueve y veintún tratamientos, en el primer y segundo ensayo, respectivamente. Se realizaron tres repeticiones, utilizándose 10 plantas/repetición para cada tratamiento, es decir, plantas expuestas a moscas virulíferas de los dos virus (ToVEV y TYLCV) y expuestas a moscas no virulíferas usadas como control negativo (plantas sin virus). Un total de 270 y 630 plantas fueron utilizadas en los dos ensayos respectivamente, (tres condiciones del vector, tres repeticiones así como tres y siete cultivares de tomate en el primer y segundo ensayo, y 10 plantas por repetición). Seguidamente, las plantas fueron observadas a diario hasta los treinta días para detectar síntomas post exposición al vector. Se calculó el porcentaje de plantas con síntomas $[(\text{número de plantas sintomáticas}/\text{número de plantas expuestas}) \times 100]$ para cada una de las repeticiones, obteniéndose así tres valores por tratamiento.

Finalmente, con el objeto de confirmar la transmisión del agente viral observada inicialmente por la aparición de síntomas, así como, para descartar genotipos (cultivar o híbridos) asintomáticos en aquellas plantas sometidas a moscas virulíferas de ambos virus, se tomaron muestras de ápices foliares en tres plantas/cultivar/repetición para la detección de la presencia de begomovirus por PCR (ver más abajo),. Igual número de muestras fueron tomadas en los testigos. El procedimiento de toma de muestras se realizó tal como fue referido anteriormente.

4.2.4 Extracción de ADN y detección de begomovirus por PCR.

Se realizó extracción de ADN utilizando el protocolo ya señalado de Gilbertson *et al.* (1991) y se amplificó por PCR con los cebadores AV494 y AC1048 diseñados por Wyatt y Brown (1996), genéricos para begomovirus.

4.2.5 Análisis estadísticos

Se utilizó un diseño factorial 3 x 3 (tres condiciones del vector y tres cultivares de tomate) para el primer ensayo y 3 x 8 (tres condiciones del vector y ocho cultivares de tomate) para el segundo ensayo, ambos hechos completamente al azar. El día de aparición de síntomas mostró una distribución normal. Para el porcentaje de plantas sintomáticas previo al análisis, los datos fueron transformados con la función $\sqrt{(X+1)}$ para homogeneizar las varianzas y ajustarlos a la distribución normal. Para el día de aparición de síntomas, el análisis de la varianza fue hecho con el Modelo Lineal General (GLM) y las comparaciones de media con la prueba de Mínimos Cuadrados ($P < 0,05$). El porcentaje de plantas sintomáticas fue analizado a través del ANOVA y la prueba de medias usando Tukey ($P < 0,05$). Los análisis estadísticos fueron hechos con el programa estadístico SAS (1996).

4.3. Resultados y discusión

4.3.1 Ensayo 1.

En plantas inoculadas con TYLCV solo se observaron síntomas en la VRG, en todas las plantas evaluadas (Cuadro 11). Por el contrario, los híbridos de Hazera, no presentaron síntomas durante los treinta días de observación. No obstante, la presencia de ADN viral fue detectada por PCR en todas las plantas sintomáticas y asintomáticas evaluadas (Figura 21). Debe destacarse que, aunque la PCR utilizada no es cuantitativa, los resultados mostrados en las filas 6 y 8 respecto a los de las filas 7 y 9 de la Figura 21, sugieren que los híbridos comerciales de Hazera evaluados manifiestan

cierta resistencia a la acumulación de TYCLV-Mld cosa que no se observa con ToVEV. Este aspecto debería confirmarse con análisis cuantitativos.

Cuadro 11. Promedio general del porcentaje de plantas con síntomas de begomovirus en los diferentes genotipos comerciales de tomate evaluados, durante 30 días después de la inoculación. Período octubre – diciembre 2008.

Tratamiento	Cultivar	Plantas sintomáticas (%) ^a (Medias)	n
TYLCV	Variedad Río Grande	100 a	30
	Helena (3228)	0 c	30
	Cecile (3229)	0 c	30
ToVEV	Variedad Río Grande	100 a	30
	Helena (3228)	56,7 b	30
	Cecile (3229)	66,7 b	30
Sin virus	Variedad Río Grande	0 c	30
	Helena (3228)	0 c	30
	Cecile (3229)	0 c	30

^a Comparaciones de medias hechas con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Medias con igual letra no difieren significativamente. n = número de plantas evaluadas

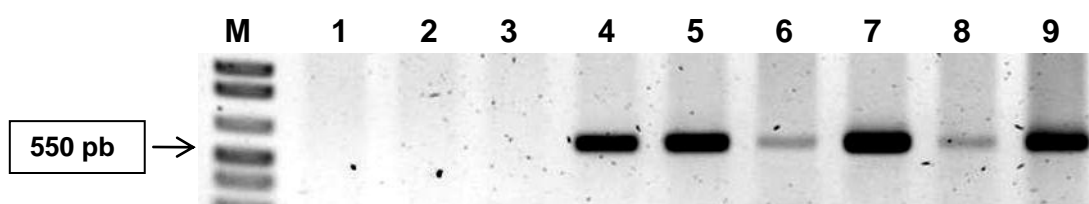


Figura 21. Detección de begomovirus en las plantas de los diferentes cultivares de tomate, *Solanum lycopersicum* L., que fueron inoculadas mediante *Bemisia tabaci* virulíferas y no virulíferas. M: marcador 1Kb. La flecha indica 550 pb. 1, 4 y 5: Tomate Cultivar Río Grande; 2, 6 y 7: Tomate Helena; 3, 8 y 9: Tomate Cecile. 1 al 3: expuestas a moscas blancas sin virus; 4, 6, 8: expuestas al TYLCV; y 5, 7 y 9 expuestas al ToVEV

Por otro lado, tanto las plantas de la VRG como de los híbridos de Hazera mostraron síntomas al ser inoculados con el ToVEV, con diferencias significativas entre los porcentajes de infección (amplitud: 100% – 56,7%, $P < 0,05$, Cuadro 12). Con relación al tiempo de aparición de síntomas, para la VRG el daño por TYLCV se manifestó alrededor de los 10 días después de la inoculación (DPI), mientras que ToVEV lo hizo en 7,8 días. En los materiales de Hazera, los síntomas causados por ToVEV se manifestaron entre los nueve y doce días (Cuadro 13) en más de la mitad de las plantas evaluadas (amplitud 56,7 a 66,7%), y la presencia del virus fue corroborada por PCR (Figura 21).

Cuadro 12. Promedio general del día de aparición de síntomas de los begomovirus transmitidos a los diferentes genotipos comerciales de tomate evaluados. Período octubre – diciembre 2008.

Virus	Cultivar	Aparición de síntomas (días) ^a	n
TYLCV	Variedad Río Grande	10 ± 1,2 a	30
ToVEV	Variedad Río Grande	7,8 ± 2,3 b	30
	Helena (3228)	11,8 ± 2,2 a	17
	Cecile (3229)	9,5 ± 1,1 ab	20

^a Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Mínimos Cuadrados ($P < 0,05$). Medias con igual letra no difieren significativamente. n = número de plantas evaluadas. n = número de plantas evaluadas.

En plantas de VRG inoculadas con TYLCV, los síntomas se caracterizaron por acortamiento de los entrenudos apicales, así como, encrespado de las hojas terminales y amarillamiento acentuado hacia los bordes (Figura 22), mientras que las plantas con ToVEV los síntomas se correspondían con mosaicos amarillentos iniciados desde nervaduras cloróticas (Figura 23), siendo estos más severos en la VRG comparados con los híbridos mejorados de Hazera.

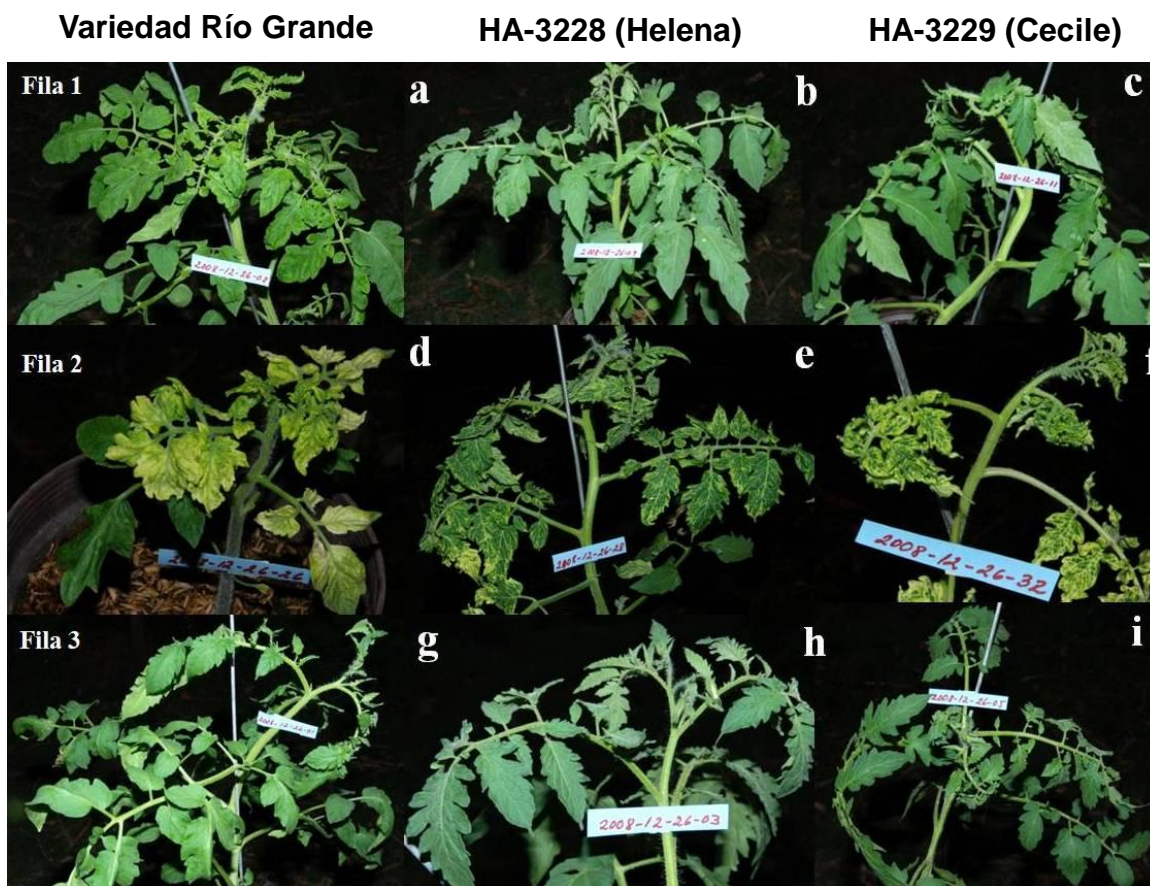


Figura 22. Plantas de los tres cultivares de tomate, *Solanum lycopersicum* L. En las columnas aparecen los cultivares y en las filas los diferentes tratamientos inoculados mediante *Bemisia tabaci* con TYLCV (fila 1), ToVEV (fila 2), y sin virus (fila 3).

4.3.2 Ensayo 2.

En este segundo ensayo, la VRG y el HRG, HRO, variedad Cherry y ShanTY inoculadas con TYLCV, mostraron síntomas en todas las plantas evaluadas (Cuadro 13) mientras que en Shirly, Tres y el Cid solo mostraron síntomas una parte de éstas (amplitud: 9,3 a 37,5%). Es importante destacar que los síntomas observados en los genotipos mejorados para resistencia a TYLCV resultaron bastante leves (Figura 23). En contraste, todas las plantas evaluadas de todos los genotipos mostraron síntomas de ToVEV aunque con diferentes niveles de gravedad. Mientras VRG, HRG, HRO,

Cuadro 13. Promedio general del porcentaje de plantas con síntomas de begomovirus en los diferentes genotipos comerciales de tomate evaluados. Período mayo – junio 2009.

Tratamiento	Cultivar	Plantas sintomáticas (%) ^a (Medias)	n
ToVEV	Variedad Río Grande	100,0 a	30
	Híbrido Río Grande	100,0 a	30
	Híbrido Río Orinoco	100,0 a	30
	Variedad Cherry	100,0 a	30
	El Cid	100,0 a	30
	Shirly (3331)	100,0 a	30
	Tres (3359)	100,0 a	30
	Shan TY(3371)	100,0 a	30
TYLCV	Variedad Río Grande	100,0 a	30
	Híbrido Río Grande	100,0 a	30
	Híbrido Río Orinoco	100,0 a	30
	Variedad Cherry	100,0 a	30
	El Cid	9,3 cd	30
	Shirly (3331)	37,5 b	30
	Tres (3359)	31,2 b	30
	ShanTY (3371)	100,0 a	30
Sin virus	Variedad Río Grande	0,0 d	30
	Híbrido Río Grande	0,0 d	30
	Híbrido Río Orinoco	0,0 d	30
	Variedad Cherry	0,0 d	30
	El Cid	0,0 d	30
	Shirly (3331)	0,0 d	30
	Tres (3359)	0,0 d	30
	ShanTY (3371)	0,0 d	30

^a Comparaciones de medias hechas con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Medias con igual letra no difieren significativamente. n = número de plantas evaluadas

Cherry y El Cid mostraron acentuados síntomas de mosaico amarillento, especialmente este último, los síntomas observados en los híbridos de Hazera resultaron en síntomas (nervaduras cloróticas) muchos más leves que en los cultivares arriba mencionados (Figura 23).

Los síntomas de TYLCV se manifestaron con mucho mayor rapidez en las variedades susceptibles, es decir, VRG, HRG, HRO, Cherry lo que resultó significativamente diferente de los híbridos mejorados El Cid, Shirly, Tres y Shanty (amplitud: 18 a 24 días, $P < 0,05$, Cuadro 14) donde tardaron más en manifestarse. En el caso de ToVEV no se observaron diferencias significativas en el tiempo de aparición de síntomas en ninguno de los genotipos analizado (Cuadro 14). La presencia de TYLCV y ToVEV fue certificada mediante la PCR, tal como se muestra en la Figura 24.

Los resultados para ambos ensayos muestran que mientras los genotipos mejorados para TYLCV no manifestaron síntomas al inocularlos con este begomovirus monopartito o éstos aparecieron de forma más tardía, frente al bipartito ToVEV, los genotipos evaluados mostraron un alto nivel de susceptibilidad con aparición de síntomas en todas las plantas evaluadas en menos de dos semanas después del PAI (amplitud: 7,8 a 11,8 días). Basado en esto, se deduce que aquellos genotipos que mostraron niveles de resistencia ante el TYLCV fueron susceptibles ante el ToVEV.

En tomate, muchas de las investigaciones orientadas a obtener fuentes de resistencia a begomovirus, han sido realizadas para el control del monopartito TYLCV (Lapidot *et al.*, 1997; 2001; Yang *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2008; Geraud *et al.*, 2009) dada las cuantiosas pérdidas ocurridas a consecuencia de este virus en varias regiones del Viejo Mundo (Polston *et al.*, 1999; Accotto *et al.*, 2000; Varma y Malathi, 2003). Algunos de esos genotipos mejorados para resistir al TYLCV han sido evaluados y han resultado promisorios por su resistencia a begomovirus bipartitos (Giordano *et al.*, 2005). Además, dada la relevancia que ha adquirido el bipartito PYMV (o ToYMV) en la América Latina, se están realizando investigaciones para determinar la resistencia de genotipos de tomate a este virus (Rampersad y Umaharan 2003, Boissot *et al.* 2008).

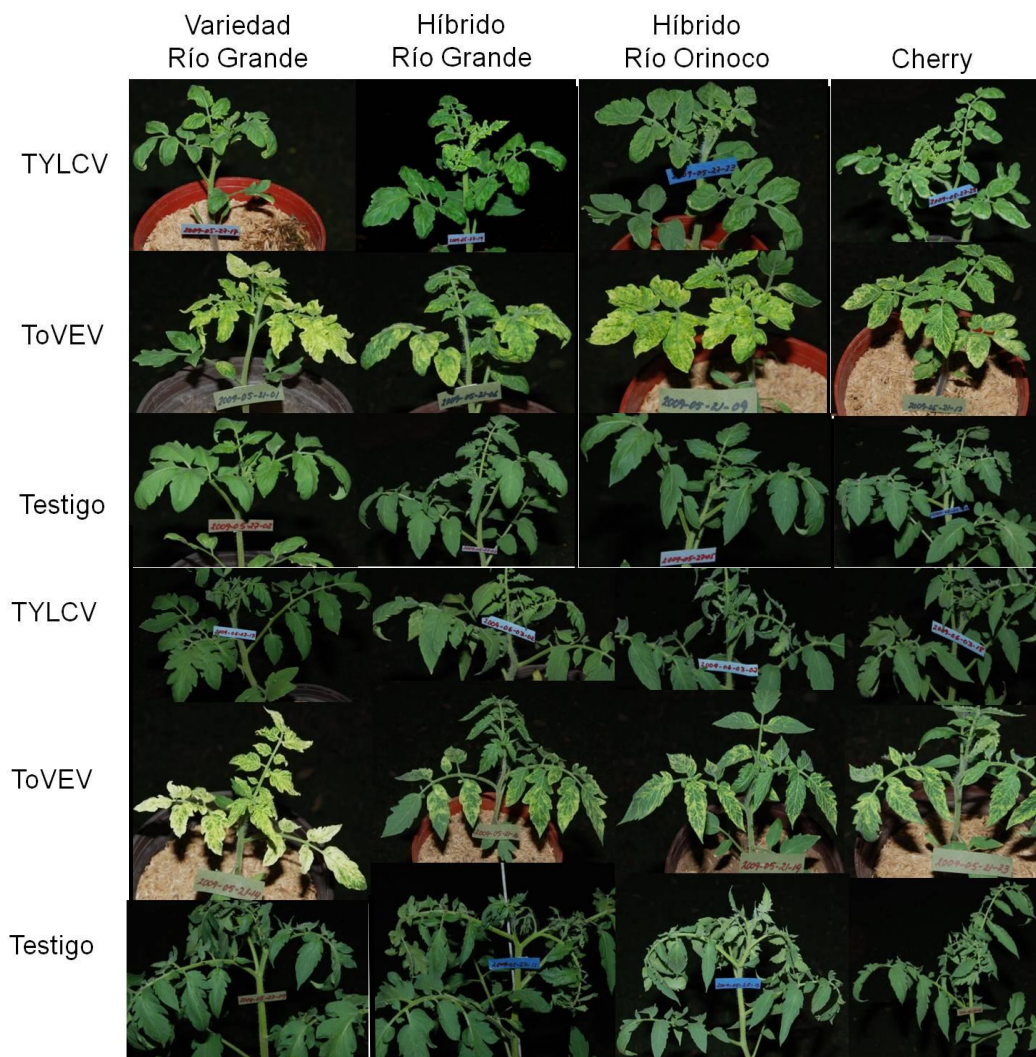


Figura 23. Plantas de los diferentes cultivares de tomate, *Solanum lycopersicum* L. En las columnas aparecen los cultivares y las filas, los diferentes tratamientos inoculados mediante *Bemisia tabaci*. Período: mayo – junio 2009

Con base a las experiencias previas (Giordano *et al.*, 2005), mientras cultivares de tomate resistentes a begomovirus bipartitos son seleccionados y mejorados, podría evaluarse el comportamiento de los cultivares mejorados para otros begomovirus bipartitos que pudieran estar presentes en los procesos epidémicos. Por ello es esencial un buen conocimiento de los begomovirus presentes en la región de estudio, dado que para el manejo de los begomovirus que afectan cultivos, una de las prácticas recomendadas es el uso de variedades resistentes (Polston y Anderson, 1997).

Cuadro 14. Promedio general del día de aparición de síntomas de los begomovirus transmitidos a los diferentes genotipos comerciales de tomate evaluados. Período mayo – junio 2009.

Tratamiento	Cultivar	Plantas sintomáticas (%) ^a (Medias)	n
ToVEV	Variedad Río Grande	9,2±2,7 b	30
	Híbrido Río Grande	9,6±2,7 b	30
	Híbrido Río Orinoco	8,9±2,6 b	30
	Variedad Cherry	8,3±2,6 b	30
	El Cid	8,2±1,8 b	30
	Shirly (3331)	8,5±1,2 b	30
	Tres (3359)	9,6±2,0 b	30
	Shan TY(3371)	11,0±2,2 b	30
TYLCV	Variedad Río Grande	9,8±0,5 b	30
	Híbrido Río Grande	9,3±0,5 b	30
	Híbrido Río Orinoco	9,8±1,0 b	30
	Variedad Cherry	9,6±0,7 b	30
	El Cid	18,0±1,0 ab	3
	Shirly (3331)	14,3±4,0 b	11
	Tres (3359)	24,6±3,2 a	9
	ShanTY (3371)	23,2±3,2 a	30

^a Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Mínimos Cuadrados ($P < 0,05$). Medias con igual letra no difieren significativamente. n = número de plantas evaluadas. n = número de plantas evaluadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los genotipos de tomate que resultaron asintomáticos ante el TYLCV, mostraron síntomas de ToVEV entre 56,7 a 100% de las plantas evaluadas, lo que confirma estudios de otros autores que indican que un cultivar resistente ante un begomovirus específico puede comportarse como susceptible para otros. Sin embargo, resulta importante señalar, que los síntomas observados en los cultivares de Hazera evaluados en ambos ensayos fueron mucho más leves comparados con el resto de los genotipos evaluados, así como que los análisis por PCR sugieren una restricción a la acumulación viral en dichos genotipos.

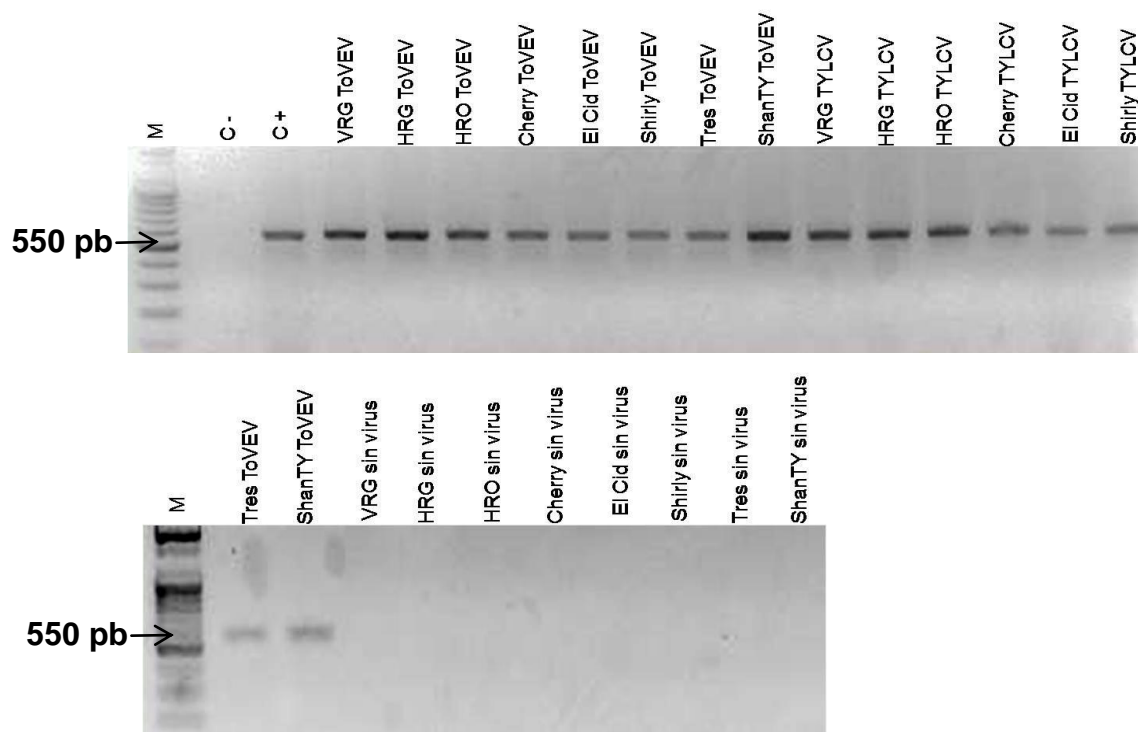


Figura 24. Detección mediante PCR de ToVEV y TYLCV en muestras de plantas de los diferentes genotipos comerciales de tomate. M: Marcador molecular., C-: Control negativo. C+: Control positivo, VRG: variedad Río Grande, HRG: híbrido Río Grande, HRO: híbrido Río Orinoco, Cherry: variedad Cherry, Shirly (HA-3331), Tres: (HA-3359), Shanty (HA-3371). La flecha indica el fragmento de 550 pb. Período: mayo – junio 2009.

Debe hacerse una mención especial al caso del híbrido El Cid mejorado para TYLCV, que mostró hipersensibilidad al ToVEV, de forma que las hojas manifestaron síntomas amarillo blanquecino, sin observarse color verde en las hojas (Figura 23), por lo cual se infiere que el área foliar estuvo severamente afectada en las plantas de este genotipo. Esto coincide con estudios previos, donde se evaluó su comportamiento frente al TYLCV y al ToVEV por separado. Mientras este cultivar se mostró asintomático ante el TYLCV (Geraud *et al.*, 2009), mostró una alta susceptibilidad ante ToVEV tanto en manifestación de síntomas como en los parámetros de crecimiento y desarrollo de plantas evaluados, tales como área foliar y materia seca de órganos vegetativos (Fernández *et al.*, 2011).

Esta respuesta diferencial podría ser consecuencia de las marcadas diferencias genéticas entre los dos begomovirus empleados en los estudios. El TYLCV pertenece al grupo de begomovirus del Viejo Mundo y ToVEV es un virus cercano genéticamente al ToYMV o PYMV, el cual pertenece al grupo de begomovirus del Nuevo Mundo. Por otra parte, el TYLCV tiene un genoma monopartito mientras que el ToVEV tiene un genoma bipartito. Se conoce que existen diferencias entre begomovirus monopartitos y bipartitos, Así, difieren, por ejemplo, en el rol de la proteína C4, fundamental en TYLCV para el desarrollo y gravedad de los síntomas, mientras que la proteína homóloga (AC4) en los begomovirus bipartitos no tiene implicación evidente sobre el desarrollo y gravedad de síntomas (Rojas *et al.*, 2005).

Adicional a esto, las respuestas diferenciales también podrían estar relacionadas con los genes de resistencia que han sido utilizados para el mejoramiento de los genotipos comerciales de tomate. Gilberston *et al.* (2011) señalan que los genes mejores caracterizados (TY1, TY3, TY4, TY5 provenientes de *Solanum chilense* y el locus TY2 de *S. habrochaites*) y para los que se han desarrollado marcadores moleculares, pueden no tener la misma efectividad para conferir resistencia a diferentes begomovirus. Así, citan como ejemplo que el gen TY2 provee resistencia para begomovirus de Asia pero no para los de África, América Central y México y mencionan, en el caso específico de la variedad de tomate Gempride, que es altamente resistente al TYLCV-IL mientras que es susceptible a la infección por el bipartito *Pepper huasteco yellow vein virus* de México..

Por tales razones, las respuestas de estos virus para evadir los mecanismos de resistencias impuestos por la planta no necesariamente implican las mismas estrategias. No obstante, otros parámetros de desarrollo (área foliar, altura de plantas, número de ramas) y rendimiento (número, peso y características físico-químicas de los frutos) de los cultivares infestados deben ser evaluados para estimar fehacientemente el grado de susceptibilidad de los mismos.

Resultan fundamentales, los estudios de distribución de los begomovirus que afectan al tomate en Venezuela, así como la reacción de los genotipos de tomate cultivados ante los begomovirus más importantes, con el fin de evitar generalizaciones sobre el comportamiento de éstos, nativos e introducidos en el país y seleccionar aquellos genotipos que muestren mejor resistencia o tolerancia mientras se generan líneas de tomate resistentes a estos principales begomovirus.

CAPÍTULO V. EVALUACIÓN EXPERIMENTAL EN CAMPO DE LAS INFECCIONES POR TYLCV EN PLANTAS DE TOMATE PROPAGADAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE PROTECCIÓN DE SEMILLEROS

5.1 Introducción

Uno de los aspectos importantes para el manejo de las enfermedades virales como problema fitosanitario que limita la producción del cultivo del tomate, es el conocimiento de la evolución de la infección en campo cuando las plantas provienen de diferentes orígenes y condiciones de propagación (Anzola y Lastra, 1978). De esta manera se puede estimar cómo de determinante es la práctica agronómica de producción aislada de semilleros para interferir con el desarrollo de la enfermedad. Ha sido señalado que el impacto de *B. tabaci* y la transmisión de begomovirus en los rendimientos del tomate depende de la edad de la planta en el momento de la infección (Hilje y Stansly, 2008). Estos mismos investigadores refieren que el período crítico de protección es alrededor de las primeras cinco semanas después del trasplante.

Estimar la velocidad de infección cuando el vector entra en contacto con la planta desde el inicio de su desarrollo, así como, experimentalmente infectar algunas plantas que simulen la fuente de inóculo en el campo, comparado con la interferencia de una barrera física proporciona las bases para conocer la velocidad de evolución de la enfermedad viral en una zona determinada partiendo de plantas propagadas bajo diferentes condiciones de protección de semilleros.

Con base a las anteriores consideraciones el objetivo de este trabajo fue evaluar experimentalmente bajo condiciones de campo la evolución de infecciones por TYLCV en plantas de tomate propagadas bajo diferentes condiciones de protección de semilleros.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Área y condiciones de estudio

Durante enero – marzo de 2008 se realizó un ensayo de campo con el fin de aproximar cómo evoluciona una epifitía de begomovirus en tomate con relación a las poblaciones de *B. tabaci* con y sin protección de semilleros. Dicho ensayo fue realizado, en el parcelamiento La Cepeda, municipio Jesús Enrique Lossada, estado Zulia, Venezuela. La zona de vida se corresponde con un bosque muy seco tropical (Ewel y Madriz, 1968).

El lote experimental consistió de una parcela de tomate de unos 2500 m² sembrados a una distancia de 1,5 x 0,3 m (distancia entre hileras x distancia entre plantas). Las plantas fueron regadas dos veces al día durante 20 minutos con emisores de dos litros por hora. Después del transplante y hasta los 21 días, las plantas fueron fertilizadas semanalmente con 18 g del fórmula completa (18-18-18) y posteriormente con un gramo de ese fórmula completa más un gramo de potasio por planta y 4 g de calcio por planta.

5.2.2 Tratamientos

Dentro de ese lote, fueron incluidos cinco tratamientos: 1. Semilleros cultivados aislados dentro de jaulas umbráculo de malla muy fina (18 x 18 hilos.cm²), 2. Semilleros cultivados aislados con algunas plantas infectadas en el laboratorio con TYLCV, 3. Semilleros expuestos mantenidos en la Unidad Técnica Fitosanitaria (UTF), 4. Semilleros expuestos mantenidos en finca y 5. Semilleros comprados en una empresa comercial de Río Claro, estado Lara. Las semillas utilizadas para todos los tratamientos fueron Río Grande Híbrido (Peto Seed®), los cuatro primeros fueron sembrados en la UTF, mientras que el último fue sembrado en la empresa antes mencionada, la cual cultiva los almácigos al aire libre.

5.2.3 Procedimiento experimental

Los semilleros fueron sembrados en bandejas de polietileno de 28 x 55 cm con 128 receptáculos que contenían turba de musgo. Posteriormente fueron fertilizados con Solub 18-18-18 y después de 25 días de germinadas, las plantas fueron trasplantadas al campo. Los tratamientos fueron distribuidos en el campo en bloques al azar con cuatro repeticiones. En cada repetición cada tratamiento constaba de 7 hileras de 10 m de largo. Como el ensayo estaba sembrado a una distancia entre hileras de 1,5 m, cada tratamiento dentro de cada repetición tenían unos 105 m².

Las observaciones se iniciaron una semana después del trasplante, contándose plantas con síntomas de afecciones virales. Para diferenciar las semanas de aparición de síntomas, las plantas eran marcadas con una cinta de color asociada a la semana de aparición. Este conteo se hizo durante seis semanas. Además, durante las últimas tres semanas del ensayo, fueron tomadas diez hojas por tratamiento por repetición de la parte central de la planta. Estas hojas fueron colocadas en bolsas plásticas debidamente rotuladas y fueron llevadas al laboratorio en cavas refrigeradas para hacer el conteo del número de ninfas de *B. tabaci* por hoja, que fue hecho con la ayuda de un estereoscopio microscópico. Las hojas fueron fotografiadas individualmente con una cámara digital. Posteriormente, las fotografías fueron procesadas con el programa Image Pro versión 4.10 (2008) para obtener el área de las mismas.

5.2.4 Analisis moleculares

Al final del ensayo, fueron tomadas las muestras de ápices foliares a razón de tres por tratamiento por repetición, cuyo procedimiento fue anteriormente referido para los otros estudios. Al igual que para los ensayos de transmisión se realizó la extracción de ADN de estas muestras y por PCR se detectó la presencia de ADN de begomovirus utilizando los cebadores degenerados diseñados Wyatt y Brown (1996). Los productos positivos de estos cebadores fueron secuenciados tal como se refirió en

el estudio del inventario nacional con el fin de conocer con que virus están relacionados.

5.2.5 Analisis estadísticos

Para los análisis estadísticos, el número de ninfas por hoja no tuvo un comportamiento normal, se hicieron varias transformaciones, adaptándola a la normalidad con la función raíz cuadrada más uno ($\sqrt{x+1}$). Se utilizó el GLM en bloques al azar. Las comparaciones de medias fueron hechas usando la prueba de mínimos cuadrados y la significancia para las comparaciones, fue fijada al 5% ($P < 0,05$).

5.3 Resultados y discusión

La Figura 25 muestra el porcentaje acumulado de plantas con síntomas de begomovirus en campo a lo largo del ciclo, para plantas provenientes las diferentes condiciones de protección de semilleros. La figura parte de la quinta semana del ciclo que representa la primera semana de trasplante luego de cuatro semanas en semillero. Allí se observa que desde esa primera semana de conteo, las plantas que provenían del vivero comercial ya mostraban más del 40% de síntomas comparado con las plantas bajo el resto de los tratamientos. De hecho ya para el tercer conteo, todas las plantas provenientes del semillero comercial tenían síntomas de begomovirus. Esto sugiere que esas plantas ya venían infectadas desde el semillero.

Así mismo, las plantas expuestas en la finca y en la UTF, fueron las siguientes en infectarse más rápido, ya que en la sexta semana (segundo conteo) el 60% de las plantas presentaban síntomas de afecciones virales alcanzando el 100% de infección en la semana ocho (cuarto conteo). En contraste, en plantas cuyos semilleros fueron cultivados protegidos, los síntomas se manifestaron más tardíamente (Figura 25). En este caso, para la sexta semana del ciclo (segunda de conteo) estaban infectadas menos del 30% de las plantas y no fue hasta la novena semana del ciclo (quinta de conteo) cuando se infectaron todas las plantas.

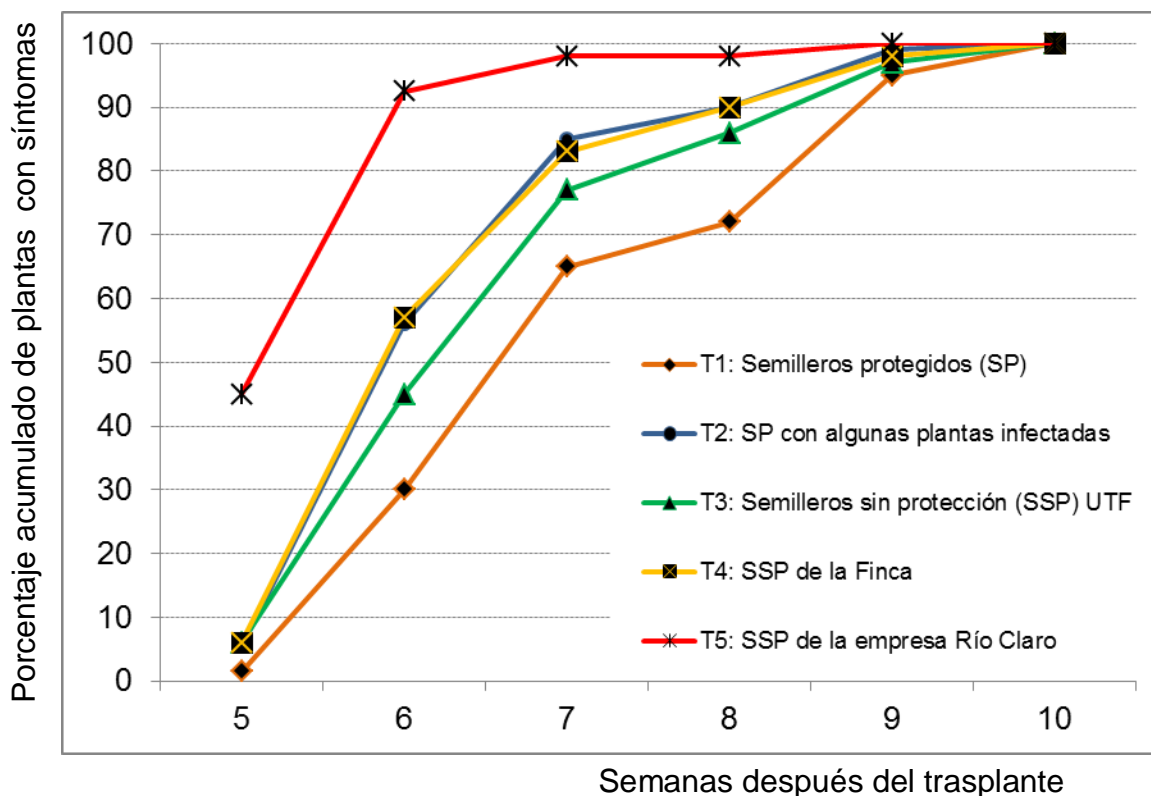


Figura 25. Porcentaje acumulado de plantas sintomáticas según el tratamiento.

Así, aunque al final del ensayo, las plantas bajo todos los tratamientos estaban infectadas, los síntomas evolucionaron con mayor rapidez en aquellas cuyos semilleros fueron cultivados en el vivero comercial y los expuestos comparados con las plantas cuyos semilleros fueron cultivados completamente protegidos.

La presencia de infección por begomovirus en las plantas con síntomas fue corroborada a través del análisis por PCR de las muestras tomadas para cada tratamiento (Figura 26). El secuenciamiento de los productos para 550 pb arrojaron que todas las muestras analizadas estaban infectadas con un aislado de TYLCV similar al reportado para Venezuela por Zambrano *et al.* (2007) con un 99% de identidad nucleotídica.

Similares resultados a los aquí encontrados fueron obtenidos por Anzola y Lastra (1978) quienes detectaron síntomas del virus del mosaico amarillo del tomate (ahora PYMV) en la primera semana después de trasplante en algunas plantas provenientes de semilleros cultivados sin protección. Estos investigadores aseveran que la presencia de plantas infectadas de tomate infectadas con el virus en esa primera semana indica que venían infectadas desde el semillero y que la menor infección en semilleros protegidos es consecuencia que la barrera física logró aislar las plantas de tomate del vector, *B. tabaci*.

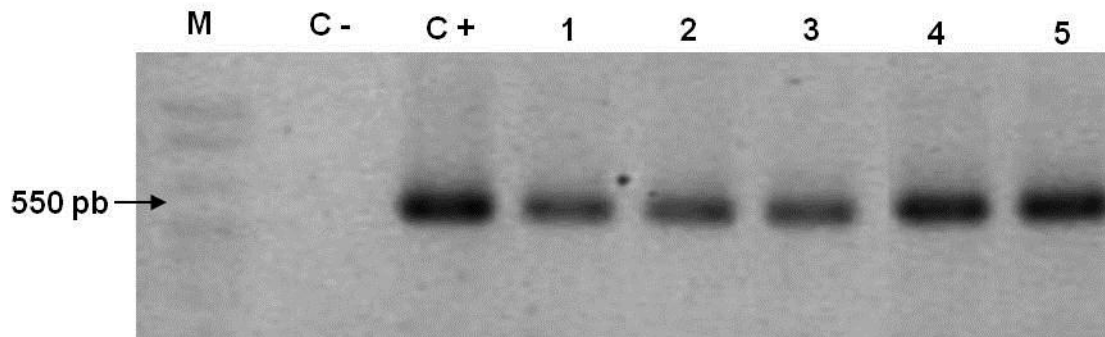


Figura 26. Detección mediante PCR de begomovirus en muestras de plantas tomate del ensayo de campo. M: Marcador molecular., C-: Control negativo. C+: Control positivo, 1. Planta de semilleros protegidos, 2. Planta de semilleros protegidos con algunas plantas infectadas con TYLCV, 3. Planta de semilleros expuestos mantenidos en la Unidad Técnica Fitosanitaria (UTF), 4. Planta de semilleros expuestos mantenidos en finca y 5. Planta de semilleros provenientes de un vivero comercial. La flecha indica el fragmento de 550 pb.

La mayor velocidad en el desarrollo de síntomas estuvo directamente asociada al desarrollo poblacional de *B. tabaci*, la cual fue significativamente superior ($P < 0,05$) en las plantas provenientes de semilleros expuestos, respecto a plantas que provenían de semilleros protegidos sin presencia de plantas previamente infestadas (Cuadro 15).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rashid *et al.* (2008) quienes detectaron una fuerte correlación entre la incidencia e infección de TYLCV en tomate y las poblaciones de *B. tabaci*.

Cuadro 15. Promedio del número de ninfas de *B. tabaci* por hoja de 70 cm² de área foliar promedio^a.

Tratamientos	Número de ninfas ^a
Semilleros protegidos (SP)	27,0± 8,4 ^c
SP con algunas plantas infestadas	44,3±18,0 ^a
Semilleros sin protección (SSP) de la UTF	36,8±13,4 ^{ab}
SSP de la Finca	47,2±22,2 ^a
SSP de Río Claro	42,3±14,2 ^a

^a Medias ± desviación estándar. Comparaciones de medias hechas con la prueba de Mínimos Cuadrados (P<0,05). Medias con igual letra no difieren significativamente. n = número de plantas evaluadas. n = número de plantas evaluadas.

Gilberston *et al.* (2011) señala que algunas moscas blancas pueden transmitir virus a plántulas en semilleros y posteriormente establecer en el campo plantas que vienen infectadas desde la fase de semillero lo que consecuentemente haría que el virus se disperse con mucho más rapidez. Además la infección temprana de plantas acarrea grandes pérdidas económicas, por ello es importante que en un programa de manejo integrado se utilicen trasplantes libre de virus y moscas blancas.

Por otro lado, estos resultados también coinciden con los encontrados por Chirinos *et al.* (2011) quienes detectaron menores poblaciones de *B. tabaci* y de infección de ToVEV en plantas de tomate cuyos semilleros se mantuvieron aislados en umbráculos con mallas muy finas combinado con la aplicación 24 horas antes del trasplante en el sustrato de la bandeja de una solución de un insecticida comercial cuyo ingrediente activo era el imidacloprid. Con base a los resultados estos investigadores concluyen que si los semilleros han estado físicamente protegidos contra el insecto vector, retrasar el desarrollo de sus poblaciones e infecciones después del trasplante en campo, previo tratamiento químico tan selectivo, podría reducir aún más la epifitía y sus consecuentes efectos negativos a la producción de este importante cultivo.

En otro estudio sobre factores que afectan la epifitía de TYLCV realizado en Cuba por Martínez y col. (2009), se obtuvieron resultados que demuestran que la alta incidencia de la enfermedad estuvo asociada con la combinación de hospedantes previos, continuidad de cultivo y aumento de la densidad de *B. tabaci*.

La evolución de una infección por begomovirus en campo depende de la interacción entre los tres niveles tróficos (planta-virus-vector), es decir, la existencia y de plantas fuentes del virus, que podrá ser propagado a nuevas plantas en menor tiempo cuando se desarrollan altas poblaciones de moscas blancas y viceversa (Romay *et al.* 2010). Esto por supuesto va a depender de el número de contactos, entre estos niveles, lo cual está directamente asociado con el tiempo en términos de desarrollo del cultivo en el cual comiencen a ocurrir los encuentros (Romay *et al.* 2010).

Estos investigadores llegan a estas conclusiones después de realizar un estudio de transmisión con ToVEV mediante *B. tabaci*, exponiendo plantas de tomate sanas a diferentes números de adultos virulíferos, y el tiempo de aparición de síntomas se acortó cuando ese número de adultos se incrementó. Por ello, infieren que esto se traduce en términos de desarrollo de una infección en el campo lo analizan de la siguiente manera: la sucesión al principio se caracteriza por la existencia de pocas plantas fuentes del virus en el campo, representadas por algunas plantas infectadas de

tomate remanentes del ciclo anterior, así como, plantas espontáneas de otras especies, hospederas del virus, lo cual está asociado con bajas poblaciones endémicas de *B. tabaci*. Algunos de estos insectos se desarrollan sobre plantas infectadas con el virus, pero dada su gran polifagia muy seguramente la mayor parte de ellos lo harán sobre diversas especies de plantas, muchas de las cuales no están infectadas. En consecuencia, la proporción de insectos virulíferos dentro de esa población tenderá a ser baja.

En el mismo trabajo, realizaron otro ensayo infectando plantas sanas con el ToVEV utilizando individuos de *B. tabaci* que adquirieron el virus en estado de ninfa, de adulto y como ninfa y adulto. Bajo esta última condición obtuvieron el mayor porcentaje de plantas infectadas en el menor tiempo. Con base a estos resultados, estos investigadores realizan el siguiente análisis: al comenzar la colonización de los nuevos campos de tomate, solo una baja proporción de estos insectos colonizadores serán virulíferos, pero ellos serían suficientes para iniciar la epifitía. Los individuos colonizadores no virulíferos, simplemente aportarán al aumento de la población dentro del sembradío, pero a medida que esto ocurre, la probabilidad que individuos no infectados entren en contacto con plantas enfermas, igualmente aumenta (adquisición del virus solo como adulto). Así mismo, se incrementa la factibilidad que adultos de *B. tabaci*, en las siguientes generaciones provengan de ninfas criadas sobre plantas enfermas y al menos inicialmente se alimenten sobre las mismas (adquisición del virus como ninfa y como adulto). La creciente participación de adultos dentro de esta última categoría en la dispersión del virus dentro del campo, por su mayor eficiencia de transmisión, tenderá a acelerar la epifitía. De esa manera, a medida que avanza la temporada de producción en una zona, podría aumentar la proporción de plantas infectadas dentro de los sembradíos, lo cual cada vez sería con plantas más jóvenes, impidiendo el desarrollo y producción de las mismas.

Esto explica lo observado en esta investigación, sobre la evolución de la epifitía de TYLCV en aquellas plantas de tomate cuyos semilleros fueron cultivados sin protección de barreras físicas. No obstante, con algunas prácticas de manejo se puede interferir

este proceso de sucesión ecológica dentro del agroecosistema para retardarla a los fines de lograr el objetivo de producción. Tal interrupción o interefencia quedó también demostrada para aquellas plantas cuyos semilleros crecieron protegidos con barreras físicas.

De este modo, para retardar el encuentro entre el vector del virus y la planta, corrobora que la protección de semilleros con mallas muy finas que fungen de barreras físicas es una de las practicas recomendadas para el manejo de este problema fitosanitario (Polston y Anderson 1997, 1999). Esto retrasaría durante el tiempo de semillero, es decir, unos veinte a treinta días el contacto del patógeno con la plántula.

Basado en los conocimientos aquí señalados, si para una zona geografica se conocen los virus predominantes, la resistencia comprobada experimentalmente de un genotipo comercial de tomate ante esos virus, aunado al cultivo de las plántulas en semilleros protegidos y el tratamiento pretrasplante en el sustrato de algún insecticida sistémico podría resultar en una combinación de practicas que de manera selectiva y efectiva se traduzca en un esquema de manejo de bajo a moderado impacto ambiental para reducir sensiblemente el efecto adverso de este importante problema fitosanitario, como aporte para el desarrollo y producción de este cultivo hortícola.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados del inventario en Venezuela, muestran que los virus relacionados con PYMV son los más frecuente del país, seguido de aquellos relacionados con ToVEV, MeMV y TYLCV, siendo el primero en todas las regiones de Venezuela.

En cuanto a los ensayos de transmisión de malezas como posibles hospederas alternas, *D. stramonium*, *S. pimpinellifolium* y *A. dubius* son potenciales hospederos de TYLCV-Mild en Venezuela. Estas especies son plantas de crecimiento espontáneo que están ampliamente distribuidas en el país, lo que probablemente, las incluye como parte de la cadena epidemiológica en la transmisión de este importante virus en tomate.

Asimismo, los genotipos de tomate mejorados mostraron resistencia ante el TYLCV, por tanto podrían ser utilizados en aquellas zonas del país donde principalmente se encuentra este virus. Sin embargo la susceptibilidad que mostraron estos genotipos ante el bipartito relacionado con ToVEV, en cuanto a manifestación de síntomas, especialmente observado en el Cid, sugiere que los mejorados ante un begomovirus no siempre muestran resistencia a otros begomovirus. No obstante, otros parámetros de desarrollo (área foliar, altura de plantas, número de ramas) y rendimiento (número, peso y características físico-químicas de los frutos) de los cultivares infectados deben ser evaluados para estimar fehacientemente el grado de susceptibilidad de los mismos.

Con relación a la estimación del desarrollo de una epifitía en campo, se observó que en plantas provenientes de los semilleros protegidos se retardó la epifitía, comparado con aquellos plantas provenientes de semilleros sembrados sin protección a plena exposición solar. Así, al interferir físicamente sembrando semilleros protegidos aunados con la evaluación de genotipos resistentes, podrían constituir alternativas para disminuir el impacto de estas afecciones virales, como problemas limitantes en la producción de este cultivo hortícola.

INDICE DE REFERENCIAS

- Accotto, G.; J. Navas-Castillo; E. Noris; E. Moriones y D. Louro. 2000. Typing of Tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *Europ. J. of Plant Path.* 106:179-186.
- Abdel, S. 1991. *Tomato yellow leaf curl virus* in Egypt. *Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of Cairo.* 42: 521-532.
- Anzola, D. y C. Lastra. 1978. Protección de semilleros de tomate y su relación con la incidencia del virus mosaico amarillo del tomate. *Agronomía Tropical.* 28(5): 473-482.
- Arnaud, L. S. E. P.; C. D. G. Santos; J. A. A. Lima y F. A. A. Feitosa. 2007. Predominância de begomovirus em tomateiros na região produtora da Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. *Fitopatol. Bras.* 32(3): 241-246.
- Behjatnia, S. A. A.; O. E. Gandomani y R. Rasoulpour. 2009. Infectivity of the cloned genome, transmission and host range of an Iranian isolate of tomato leaf curl geminivirus. *Iran. J. Plant. Path.* 45 (1): 13-18
- Ber, R.; N. Navot; D. Zamir; Y. Antignus; S. Cohen y H. Czosnek. 1990. Infection of tomato by the *Tomato yellow leaf curl virus*: susceptibility to infection, symptom development and accumulation of viral DNA. *Arch. Virol.* 112: 169-180.
- 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.
- Briddon, R.; B. Patil; B. Bagewadi; M. Nawaz-ul-Rehman y C. Fauquet. 2010. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *Bmc Evolutionary Biology* 10: 97.
- Brown, J. K. y H. Czosnek. 2006. Whitefly transmission of plant viruses. *Advances in Botanical Research.* Editado por R. T. Plumb. Academic Press. Vol. 36.
- Brown J. K.; C. M. Fauquet; R. W. Briddon; M. Zerhini; E. Moriones y J. Navas-Castillo. (2012). *Geminiviridae*. In: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens y E. J. Lefkowitz. (eds) *Virus Taxonomy. Ninth Report of the ICTV.* Elsevier/Academic Press, London, pp 351–373.

- Caballero, R. 1996. Identificación de moscas blancas. En: metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus. Luko Hilje Editor. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica. 133p.
- Chirinos, D. T.; P. Güerere P.; F. Geraud P.; 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. Col. Entomol.* 35(1):22-27.
- Chirinos, D.; M. Paradiso; R. Davila y F. Geraud. 2011. Interferencia en la transmisión del Tomato Venezuela Virus (ToVEV). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 28: Suplemento 1. En prensa.
- Chirinos, D. T. y F. Geraud-Pouey. 2011. El manejo de plagas agrícolas en Venezuela. Reflexiones y análisis sobre algunos casos. *Interciencia.* 36 (3): 192-199.
- Chirinos, D. T.; F. Geraud-Pouey; G. Romay; P. Güerere; M. A. Franco y I. Galindo-Castro. 2012. Evaluación de genotipos comerciales de tomate por su resistencia a Begomovirus. *Interciencia.* 36(6): 451-456.
- Chu, D.; F. Wan; B. Xu; Q. Wu y Y. Zhang. 2008. Comparative analysis of population genetic structure in *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes B and Q based on ISSR marker. *Agricult. Sci. China.* 7 (11): 1348-1354
- Cohen, S. y Y. Antignus Y. 1994. Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. - *Advances in Disease Vector Research* 10: 259-288.
- Cohen S. y Nitzany F. E. 1996. Transmission and host range of tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathol.* 56: 1127-1131
- Coutts, R. H. A.; R. S. Coffin; E. J. F. Roberts y W. D. O. Hamilton. 1991. The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of potato yellow mosaic virus. *Jour. Gen. Virol.* 72 (7): 1515–1520.
- De Barro, P. J.; S. Liu; L. M. Boykin y A. B. Dinsdale. 2011. *Bemisia tabaco*: A statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.* 56: 1-19.
- De Blas, C.; Y. X. Jiang; I. I. D. Belford; G. Nombela y M. Muñiz. 2004. Effect of *Bemisia tabaci* biotype in the transmission of *Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus* (TYLCSV-ES) between tomato and common weeds: Short communication, *Span. J. of Agric. Res.* (1): 116-120.
- Debrot, E.; F. Herold y F. Dao. 1963. Notas preliminares sobre el amarillamiento del tomate en Venezuela. *Agron. Trop.* 10: 33-41.

- Debrot, E. y F. Centeno. 1985. Infección natural de la papa en Venezuela con el mosaico amarillo del tomate, un geminivirus transmitido por moscas blancas. *Agron. Trop.* 35: 125-138.
- Díaz-Pendón J. A.; M. C. Cañizares; E. Moriones; E. R. Bejarano; H. Czosnek y J. Navas-Castillo. 2010. Tomato yellow leaf curl viruses: ménage à trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Mol. Plant Pathol.* 11(4):441-50
- Duffy, S. y E. C. Holmes. 2007. Multiple introductions of the Old World Begomovirus Tomato yellow leaf curl virus into the New World. *Applied and Environmental Microbiology.* 73: 7114-7117.
- Ewel J., Madriz A. 1968. Zonas de vida de Venezuela. Edit. Sucre, Caracas, Venezuela, 264 p.
- Faría, R, A. E. 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.
- Fauquet, C. y J. Stanley. 2003. *Geminiviridae* classification and nomenclature: progress and problems. *Ann. Appl. Bio.* 142 (2): 165-189.
- Fauquet, C.; M. Mayo; J. Maniloff; U. Desselberger y L. Ball. 2005. Virus taxonomy: eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses. London, San Diego. Elsevier Academy Press. 1162 p.
- 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.
- Fazeli, R.; J. Heydarnejad; H. Massumi; M. Shaabani y A. Varsani. 2009. Genetic diversity and distribution of tomato-infecting begomoviruses in Iran. *Virus Genes.* 38:311–319.
- Fernández, C.; J. Chirinos; J. Mejías; A. Gómez; F. Geraud y D. Chirinos. 2011. Growth of four tomato (*Solanum lycopersicum* L.) accesions infected with Tomato Venezuela Virus (ToVEV). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 28: Suplemento 1. En prensa.
- Frohlich, D.; I. Torres-Jerez; I. Bedford; P. Markham y J. K. Brown. 1999. A phylogeographic analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Mol. Ecol.* 8: 1593-1602.
- Gafni, Y. y B. L. Epel. 2002. The role of host and viral proteins in intraand inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Phyl. Mol. Plant Pathol.* 60: 231-241.

- García-Andrés, S.; F. Monci; J. Navas-Castillo y E. Moriones. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Viol.* 350:433-442
- Geraud-Pouey, F.; D. T. Chirinos y G. Rivero. 1995. Artrópodos asociados con el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Venezuela. *Bol. de Entomol. Venezol. (Venezuela)* 10 (1): 31-49
- 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 (Venezuela)* 21 (1): 23-31.
- Ghanim, M. y H. Czosnek, 2000. Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus (TYLCV-Is) Is Transmitted among Whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a Sex-Related Manner. *Journ. Virol.* 74 (10):4738–4745.
- Gianessi, L.; S. Sankula y N. Reigner.2003. Plant biotechnology: potential impact for improving pest management in european agriculture, tomato – virus-resistant case study. The National Center for Food and Agricultural Policy. Washington D.C. (www.nctap.org)
- Giordano B; V. L. Silva-Lobo; F. M. Santana; M. E. N. 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.
- Gilbertson, 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 en the Dominican Republic. *J. Gen. Virol.* 72 (11): 2843-2848.
- Gilberston, R. L.; M. Rojas y E. Natwick. 2011. Development of Integrated Pest Management (IPM) Strategies for Whitefly (*Bemisia tabaci*) –Trasmissible Geminiviruses. Cap 12. En: *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-infected Hosts Plants. Wiston Thompson (Ed.) Springer. 323-344.
- Goldman, V. y H. Czosnek. 2002. Whiteflies (*Bemisia tabaci*) issued from eggs bombarded with infectious DNA clones of *Tomato yellow leaf curl virus* from Israel (TYLCV) are able to infect tomato plants. *Arch. Virol.* 147: 787-801.
- Gómez, O.; M. Piñón; Y. Martinez; M. Quiñonez; D. Fonseca y H. Laterrot. 2008. Breeding for resistance to begomovirus in tropic-adapted tomato genotypes. *Plant Breeding.* 123: 275-279.

- Gray, S. M. y N. Banerjee. 1999. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(1) : 128-148.
- Greathead, A. H. 1986. Host plants. En: *Bemisia tabaci* a Literature Survey on the Cotton Whitefly with an Annotated Bibliography. Cock. M.J.W. (ed.). CAB International Institute, Biolog. Control. Silwood Park, UK. p. 17-26.
- Güerere, P.; D. T. Chirinos; F. Geraud-Pouey; E. Moriones; M. A. Santana; M. A. Franco; I. Galindo-Castro y G. Romay. 2012. Experimental transmission of the mild strain of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) to *Amaranthus dubius* by *Bemisia tabaci*. *Phytoparasitica.* 40: 369-373.
- Guzman, P., C.R. Arredondo, D. Emmatty, R.J. Portillo y R.L. Gilberton. 1997. Partial characterization of two whitefly-transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant Dis.* 81:312.
- Hilje, L. 1995. Aspectos biotecnológicos de *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Mesoamérica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).* 35: 46-54.
- Hilje, L. y P. A. 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
- Hull, Roger. 2004. Matthews. *Plant Virol.* Acad. Press. 1001pp
- Infante, D.; N. Piven y R. de Uzcátegui. 1996. Resistance to tomato yellow mosaic geminivirus and presence of viral DNA in some species of solanacea. *J. Phytopathology.* 144 :163-165.
- Jones, R. 2003. Plant Viruses Transmitted by Whiteflies. *Europ. J. of Plant Pat.* 109 (3): 195-219
- Jordá, C.; I. Font y P. Martínez. 2001. Current status and new natural host of *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in Spain. *Plant Dis.* 85(4):445.
- Kashina, B.; R. Mabagala y A. Mpunami. 2002. Reservoir weed hosts of *Tomato yellow leaf curl* begomovirus from Tanzania. *Arch. of Phytopath. and Plant Prot.* 35(4): 269-278.
- Lapidot, M.; M. Friedman; 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
- Lapidot, M.; M. Friedman; M. Pilowsky; R. Ben-Joseph y S. Cohen. 2001. Effect of host plant resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. *Phytopathol.* 91: 1209-1213.

- Lapidot, M.; L. Ben-Joseph; Z. Cohen; Machbash y D. Levy. 2006. Development of a scale for evaluation of tomato yellow leaf curl virus resistance level in tomato plants. *Phytopathol* 96 (12): 1404-1408.
- Lapidot, M.; G. Weil; L. Cohen; L. Segey y V. Gaba. 2007. Biolistic inoculation of plants with Tomato yellow leaf curl virus DNA. *J. Virol. Meth.* 144(1-2):143-8.
- Lastra, J. R. y R. C. de Uzcátegui. 1975. Viruses affecting tomatoes in Venezuela. *Phytopathol. Z.* 84:253-258.
- Lefevre, P.; M. Hoareau; H. Delatte; B. Reynaud, y J. M. Lett. 2007. A multiplex PCR method discriminating between the TYLCV and TYLCV-Mld clades of Tomato yellow leaf curl virus. *Journal of Virological Methods.* 144, 165–168.
- Lefevre, P.; D. P. Martin; G. Harkins; P. Lemey; A. J. A. Gray; S. Meredith; F. Lakay; A. R. Monjane; J. M. Lett; A. Varsani y J. Heydarnejad. 2010. The Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from the Middle East to the World. - *PLoS Pathog* 6: (10) e1001164.
- Linares, B. 1997. Aspectos epidemiológicos del virus del mosaico amarillo del tomate (Toymv) y su vector *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleydidae) en el cultivo de tomate agroindustrial en Venezuela. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela (UCV).
- Ling, K. S.; A. M. Simmons; R. L. Hassell; A. P. Keinath y J. E. Polston. 2006. First report of Tomato yellow leaf curl virus in South Carolina. *Plant Dis.* 90:379
- Louise, R. 1975. Whiteflies on beans in the western hemisphere. Workshop on Bean Production CIAT. 22 p. December 1 -3. Cali, Colombia.
- Lupoli, R.; G. Labonne y M. Yvon. 1992. Variability in the transmission efficiency of potyviruses by different clones of *Aphis gossypii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 65 (3): 291-300
- Martínez, Y.; M. Martínez; M. Quiñones; I. Miranda; J. Holt y T. Chancellor. 2009. Estudio de factores que influyen en la epifitología del complejo mosca blanca-geminivirus en la región oriental de Cuba. *Rev. Protección Veg.* 24: (1). 49.
- Marquez-Martin, B.; L. Aragon-Caballero; E. Fiallo-Olive; J. Navas-Castillo y E. Moriones. 2011. *Tomato leaf deformation virus*, a novel begomovirus associated with a severe disease of tomato in Peru. *Eur. J. Plant. Pathol.* 129:1–7.
- Ministerio de Agricultura y Tierras (MAT). 2007. Estadísticas agrícolas. <http://www.mat.gob.ve>.

- Monci, F.; S. Sanchez-Campos; J. Navas-Castillo y E. Moriones. 2002. A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. - *Virology* 303: 317-326.
- Morales, F. J.; C. Muñoz, M. Castaño y A. C. Velasco. 2000. Geminivirus transmitidos por mosca blanca en Colombia. *Fitopatol. Colomb.* 24:95-98
- Morales, F. J. y P. K. Anderson. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.* 146:415-441.
- Morales, F. J.; R. Lastra; R. C. de Uzcátegui y L. Calvert. 2001. *Potato yellow mosaic virus*: a synonym of *Tomato yellow mosaic virus*. *Arch. Virol.* 146 (11): 2249-2253.
- Morales, P. y M. Cermelli. 2001. Evaluación de la preferencia de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) en cinco cultivos agrícolas. *Entomotrópica.* 16(3): 181-185.
- Morales, F. J. y P. G. Jones. 2004. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. - *Virus Research* 100: 57-65.
- Morales, Francisco J. 2006. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Adv. Virus Res.* 67:127-162.
- Moriones, E. y J. Navas-Castillo. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res.* 71 (1): 123-134.
- Moriones, E. y J. Navas-Castillo. 2010. Tomato Yellow Leaf Curl Disease Epidemics. En: Stansly, P. A. y S. E. Naranjo (eds.). *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer Netherlands, pp. 259-282.
- Nava, A.; F. Ochoa; G. Trujillo; F. Geraud; L. Hernández; R. Lastra y G. Rivas. 1996. Detección de virus en zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Venezuela. I Estados Aragua y Zulia. *Rev Fac Agron (LUZ).* 13:285-292.
- Nava, A.; G. Trujillo; D. T. Chirinos y G. Rivero. 1997. Detección de virus de las zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Venezuela. II. Estados andinos (Mérida, Táchira y Trujillo). *Rev. Fac. Agron. LUZ* 14: 611-624.
- Nava, A.; G. Trujillo; D. T. Chirinos y G. Rivero. 1998a. Detección de virus de las zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Venezuela. III. Estados centro occidentales (Lara, Portuguesa, Barinas y Cojedes). *Rev. Fac. Agron. LUZ* 15: 23-29.

- Nava, A.; G. Trujillo; D. T. Chirinos y G. Rivero. 1998b. Detección de virus de las zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Venezuela. IV. Estados Zulia. Rev. Fac. Agron. LUZ 15: 135-141.
- Nava, A.; C. P. Patte; E. Giebert y J. E. Polston. 2006. Detection and variability of begomoviruses in tomato from the andean states of Venezuela. Plant Dis. 90: 61-66.
- 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. On line.
- Navas-Castillo, J.; S. Sánchez-Campos y J. A. Díaz. 1999. Tomato yellow leaf curl virus-Is causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. Phytopathol. 83 (1): 29-32.
- Navas-Castillo, J.; E. Fiallo-Olivé y S. Sánchez-Campos. 2011. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. Annu. Rev. Phytopathol. 49:219-248
- Padidam, M.; S. Sawyer y C. M. Fauquet. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. Virology. 265: 218-225.
- Papayiannis, L.C.; N. I. Katis; A. M. Idris y J. K. Brown. 2011. Identification of weed hosts of Tomato yellow leaf curl virus in Cyprus. Plant Dis. 95(2), 120–125.
- Paprotka, T.; V. Meztler y H. Jeske. 2010. The first 1-like alfa satellites in association with new world begomoviruses in natural infections. En imprenta.
- Pérez de Castro, A. 1995 Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Universidad Politécnica de Valencia, España. Disponible en: <http://riunet.upv.es>
- Pérez de Castro, A.; M. J. Díez y F. Nuez. 2008. Exploiting partial resistance to tomato yellow leaf curl virus derived from *Solanum pimpinellifolium* upv16991. Plant Dis 92 (7): 1083-1090.
- Piven, N. M. y R. de Uzcátegui. 1995. Resistance to tomato yellow mosaic virus in species of *lycopersicon*. Plant Dis. 79 (6): 594
- Polston, J. E.; D. Bois; C. A. Serra y S. Concepción. 1994. First report of a tomato yellow leaf curl-like geminivirus from tomato in the Western Hemisphere. Plant. Dis. 78:831.
- Polston, J. y P. Anderson. 1997. The emergence of whitefly – transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. Plant Dis. 81(12): 1358-1369.

- Polston, J.; R. McGovern y L. Brown. 1999. Introduction of *Tomato yellow leaf curl virus* in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. *Plant Dis.* 83: 984-988.
- Polston, J. y P. Anderson. 1999. Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por mosca blanca en tomate en el Hemisferio Occidental. *Man. Integ. Plag. (Costa Rica)* 53: 24-42.
- Polston, J. E.; L. Cohen; T. A. Sherwood; R. Ben-Joseph y M. Lapidot. 2006. Capsicum Species: symptomless hosts and reservoirs of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Phytopathol.* 96(5): 447-452.
- Ramos, P. L.; O. Guerra; V. Dorestes; N. Ramírez; R. Rivera-Bustamante y P. Oramas. 1996. Detection of TYLCV in Cuba. *Plant Dis.* 80 (12):1208.
- Rampersand, S. N. y P. Umaharan. (2003). Identification of Resistance to *Potato yellow mosaic virus-Trinidad Isolate* PYMV-TT) Among *Lycopersicon* Species. *Plant Dis.* 87: 686-691.
- Rashid, M. H.; I. Hossain; A. Hannan; S. A. Uddin y M. A. Hossain. 2008. Effect of different dates of planting time on prevalence of Tomato yellow leaf curl virus and whitefly of tomato. *J. Soil. Nature.* 2 (1):01-06
- Roberts, E. J. F.; K. W. Buck y R. H. A. Coutts. 1986. A new virus infecting potatoes in Venezuela. *Plant Dis.* 70 (1): 603.
- Rojas, M.; R. Gilbertson; D. Russell y D. Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 77: 340- 347.
- Rojas, M. R.; C. Hagen, W. J. Lucas y R. L. Gilbertson. (2005). Exploiting Chinks in the Plant's armor: Evolution and Emergence of Geminivirus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 361–394
- Rodríguez-López, M. J.; E. Garzo; J. P. Bonani; A. Fereres; R. Fernández-Muñoz y E. Moriones. 2011. Whitefly resistance traits derived from the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* affect the preference and feeding behavior of *Bemisia tabaci* and reduce the spread of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Phytopathology* 101: 1991-1201.
- Romay, G.; D. Chirinos; F. Geraud-Pouey y C. Desbiez. 2010. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Arch Virol.* 155: 1843-1847.

- 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.
- Romero, J. S.; M. González; N. Pérez y E. Pérez. 2002. Malezas hospedantes de Begomovirus en Cuba. *Man. Integr. de plagas y Agroecol. (Costa Rica)*. 66: 36-38.
- Romero, O.; D. Chirinos y F. Geraud. 2012. Trasmision experimental de Tomato Venezuela Virus TOVEV por *Bemisia tabaci* a varias especies de plantas. X Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. La Habana, Cuba. En resúmenes.
- Rubinstein, G. y H. Czosnek. 1997. Long – term association of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *J. Gen. Virol.* 78 (10): 2683 – 2689.
- Salas, J. y E. Arnal. 2001. *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1899) biotipo B, primer registro para Venezuela utilizando RAPD`s-PCR. *Entomotropica*. 16(3): 181-185.
- Salati, R.; M. F. Nahkla; M. R. Rojas; P. Guzmán; J. Jaquez; D. P. Maxwell y R. L. Gilbertson. 2002. Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathol.* 92 (5): 487-496.
- Sánchez-Campos, S.; J. Navas-Castillo; R. Camero; C. Soria; J. A. Díaz y E. Moriones. 1999. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemic in Spain. *Phytopathol.* 89(11):1038-1043.
- Sánchez-Campos, S.; J. Navas-Castillo; F. Monci; J. A. Díaz y E. Moriones. 2000. *Mercurialis ambigua* and *Solanum luteum*: two newly discovered natural hosts of Tomato yellow leaf curl geminivirus. *Europ. J. of Plant Pathol.* 106 (4): 391-394.
- Sawalha, Hazem. 2009. Ocurrance of Tomato yellow leaf curl virus in volunteer tomato, jimsonweed and tobacco in North West Bank: distribution of virus natural reservoirs in summer season. *An-Najah Univers. J. for Res. - Natural Sciences*. 23: 73-91
- Schnee, Ludwing. 1984. Plantas comunes de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. 822 p.
- Seal, S. E.; M. J. Jeger y F. Van den Bosch. 2006a. Begomovirus evolution and disease management. *Adv. Virus Res.* 67:297-316.

- Seal, S. E., F. van den Bosch y M. J. Jeger. 2006b. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25: 23-46.
- Silva, S. J. C.; G. P. Castillo-Urquiza; B. T. Hora-Júnior; I. P. Assunção; G. S. A. Lima; G. Pio-Ribeiro; E. S. G. Mizubuti y F. M. Zerbini. 2012. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. - *Plant Pathology* 61: 457-467.
- Stanley, J. 1995. Analysis of *African cassava mosaic virus* recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* 206 (1): 707-712.
- Stanley, J.; M. Boulton y W. Davies. 2001. *Geminiviridae*. Encyclop. of Life Sc. Nat. Publishing Group / www.els.net
- Stanley, J.; D. M. Bisaro; R. W. Briddon; J. K. Brown; C. M. Fauquet; B. D. Harrison; E. P. Rybicki y D. C. Stenger. 2005. Geminiviridae. (In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L.A. Ball (Eds.), *Virus Taxonomy, VIII Report of ICTV* (pp 301–326). Elsevier/Academic Press, London.
- Tesoriero, L. y S. Azzopardi. 2006. Tomato yellow leaf curl virus in Australia. Primefacts. NSW Department of Primary Industries.
- Umaharan, P.; M. Padidam; R. H. Phelps; R. N. Beachy y C. M. Fauquet. 1998. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology*. 88 (12):1262-1268.
- United State Department Agriculture, FSA. 2007. World markets and trade: Tomato & Tomato Products. En: www.fsa.usda.gov.
- Uzcátegui de, R. C. y R. Lastra. 1978. Transmission and physical properties of the causal agent of mosaico amarillo del tomate (tomato yellow mosaic). *Phytopathology* 68:985-988.
- Varma, A y V. Malathi. 2003. Emerging Geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Ann. App. Biology*. 142 (2):145–164.
- Wyatt, S. D y J. K. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 86: 1288-1293.
- Yang Y.; T. A. Sherwood; C. P. Patte y J. E. Polston. 2004. Use of *Tomato yellow leaf curl virus*(TYLCV) rep genes sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. *Phytopathology* 94: 490-496.

- Zambrano, K.; O. Carballo; F. Geraud; D. Chirinos; C. Fernández y E. Marys. 2007. First Report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Venezuela. *Plant Dis.* 91: 768.
- 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* in Venezuela. *Arch. Virol.* 156:2263–2266
- Zambrano K., T. Fernández-Rodríguez y E. Marys. (2012). Molecular characterization of a new begomovirus that infects *Euphorbia heterophylla* and *Solanum lycopersicum* in Venezuela. *Arch. Virol.* 157:379–382
- Zenthu, Y. y M. J. Davis. 2000. Partial characterization and host range of tomato yellow leaf curl virus in South Florida. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 113: 185-190.

ANEXOS

Anexo 1. Información de las muestras del inventario de begomovirus. Período: 2000 - 2009

Código	Localidad	Municipio	Estado	550	1300	Homología	NSI	Siglas
2005-01-17-06	Fuerte Tavacare	Barinas	Barinas	1	1	Baja HomologíaNew7?		BH 7
2005-01-19-01	UNELLEZ	Barinas	Barinas	1	1	Baja HomologíaNew7?		BH 7
2005-07-22-01	Los Cilantrillos	Lagunillas	Zulia	1	1	Baja HomologíaNew8?		BH 8
2009-06-03-30	Finca El Remanso	Machiques	Zulia	1	1	Baja HomologíaNew9?		BH 9
2009-11-05-08	Loma de Guerra	Antolín del C.	Nueva E.	1	1	Baja HomologíaNew10?		BH 10
2004-12-11-05	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Baja HomologíaNew1?		BH 1
2004-12-11-09	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Baja HomologíaNew2?		BH 2
2008-01-26-01	Parc. El Rosario	F. Bustamante	Zulia	1	1	Baja homologíaNew2		BH 2
2005-01-07-01	Las Carmelitas	Sucre	Zulia	1	1	Baja HomologíaNew3?		BH 3
2006-04-01-01	Altamira	Bolívar	Trujillo	1	1	Baja HomologíaNew4?		BH 4
2006-04-01-05	Altamira	Bolívar	Trujillo	1	1	Baja HomologíaNew5?		BH 5
2006-04-01-06	Altamira	Bolívar	Trujillo	1	1	Baja HomologíaNew5?		BH 6
2006-07-12-03	San Gerónimo	Cocorote	Yaracuy	1	1	Baja HomologíaNew6		BH 6
2007-07-26-03	Toico, Palo Gordo	Cárdenas	Táchira	1	1	Baja homologíaNew6?		BH 6
2007-02-01-01	Fca. Luz Marina	Mara	Zulia	1	1	Baja HomologíaNew7?		BH 7
2006-07-12-02	San Gerónimo	Cocorote	Yaracuy	1	1	Merremia mosaic geminivirus AV1, AC3, AC2, and AC1 genes	94%	MeMV
2006-07-12-05	San Gerónimo	Cocorote	Yaracuy	1	1	Merremia mosaic geminivirus AV1, AC3, AC2, and AC1 genes	95%	MeMV
2007-12-24-05	El Tocuyo	Vega Arriba	Cojedes	1	1	Tomato mosaic leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	94%	MeMV
2004-08-04-01	La Recta	Monay	Trujillo	1	1	Tomato mosaic leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	98%	MeMV
2004-08-05-01	San Antonio	Monte Carmelo	Trujillo	1	1	Tomato mosaic leaf curl virus segment DNA A, complete sequenc	98%	MeMV
2005-01-15-01	Santa Inés	Barinas	Barinas	1	1	Merremia mosaic virus isolate PR4-H6 segment DNA-A, complete sequenc	94%	MeMV
2005-01-15-02	UNELLEZ	Barinas	Barinas	1	1	Tomato mosaic leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	98%	MeMV

2005-01-19-04	UNELLEZ	Barinas	Barinas	1	1	Tomato mosaic leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	98%	MeMV
2005-01-21-01	Ciudad Bolivia	Pedraza	Barinas	1	1	Merremia mosaic virus isolate PR4-H6 segment DNA-A, complete sequence	94%	MeMV
2005-06-04-04	Sara Linda	Rafael Rangel	Trujillo	1	1	Tomato mosaic leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	96%	MeMV
2008-11-16-07	El Cabredal	A. E. Blanco	Lara	1	1	Tomato mosaic leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	98%	MeMV
2008-11-17-08	Lourdes	Morán	Lara	1	1	Tomato mosaic leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	98%	MeMV
2009-01-29-06	Diluvio El Palmar	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Tomato mosaic leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	99%	MeMV
2009-11-07-01	Paraguachi	Antolín del C.	Nueva E.	1	1	Merremia mosaic virus isolate PR4-H6 segment DNA-A, complete seque	94%	MeMV
2009-11-07-02	Paraguachi	Antolín del C.	Nueva E.	1	1	Merremia mosaic virus clone BZ111 replication protein (rep) and coat p	94%	MeMV
2009-11-07-03	Paraguachi	Antolín del C.	Nueva E.	1	1	Tomato mosaic leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	98%	MeMV
2003-12-07-01	Quibor	Jiménez	Lara	1	1	Potato yellow mosaic virus from Martinique	93%	PYMV
2004-12-05-02	La Soledad	Federación	Falcón	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome	94%	PYMV
2004-12-05-03	La Soledad	Federación	Falcón	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A	94%	PYMV
2005-01-07-02	Las Carmelitas	Sucre	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A	94%	PYMV
2005-01-07-03	Las Carmelitas	Sucre	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A	94%	PYMV
2005-01-07-07	Las Carmelitas	Sucre	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus Tomato strain	92%	PYMV
2005-01-13-04	Casa de Teja	Anzoátegui	Cojedes	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A	95%	PYMV
2006-02-22-01	Luis Beltrán Freites	Jesús Mujica	Sucre	1	1	Potato yellow mosaic Trinidad virus-[Trinidad & Tobago] strain	98%	PYMV
2006-02-22-02	Luis Beltrán Freites	Jesús Mujica	Sucre	1	1	Potato yellow mosaic Trinidad virus-[Trinidad & Tobago] strain	97%	PYMV
2006-02-22-03	Luis Beltrán Freites	Jesús Mujica	Sucre	1	1	Potato yellow mosaic Trinidad virus-[Trinidad & Tobago] strain	97%	PYMV
2006-02-22-04	Luis Beltrán Freites	Jesús Mujica	Sucre	1	1	Potato yellow mosaic Trinidad virus-[Trinidad & Tobago] strain	98%	PYMV
2006-02-22-06	Luis Beltrán Freites	Jesús Mujica	Sucre	1	1	Potato yellow mosaic Trinidad virus-[Trinidad & Tobago] strain	97%	PYMV
2006-04-11-01	Muchuche	Carache	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A	94%	PYMV
2006-04-11-02	Muchuche	Carache	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome seque	94%	PYMV
2006-04-11-04	Muchuche	Carache	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A	94%	PYMV
2007-02-01-02	Fca. Luz Marina	Mara	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus Tomato strain AV1 and AC1 genes, partial cd	97%	PYMV

2007-03-16-07	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2007-03-16-10	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus from Martinique replication-associated	93%	PYMV
2007-07-27-03	Toico, Palo Gordo	Cárdenas	Táchira	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2007-07-27-06	Toico, Palo Gordo	Cárdenas	Táchira	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2007-07-27-10	Toico, Palo Gordo	Cárdenas	Táchira	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2007-07-28-03	El Japón vía Rubio	Junín	Táchira	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2007-07-30-01	Peribeca	Independencia	Táchira	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	95%	PYMV
2007-07-30-03	Peribeca	Independencia	Táchira	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2007-07-30-04	Peribeca	Independencia	Táchira	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2007-07-30-05	Peribeca	Independencia	Táchira	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2007-07-31-01	La Petrolea	Córdoba	Táchira	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2008-02-17-01	Los Merecures	Vía Chirgua	Carabobo	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2000-12-27-07	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome	95%	PYMV
2002-04-18-01	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequence	95%	PYMV
2007-06-16-02	El Charal	Tucaní	Mérida	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2007-06-16-03	El Charal	Tucaní	Mérida	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2007-06-16-05	El Charal	Tucaní	Mérida	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2003-12-07-09	Quibor	Jiménez	Lara	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2003-12-07-10	Quibor	Jiménez	Lara	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2003-12-07-16	El Molino	Jiménez	Lara	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2004-03-10-01	U T F	Maracaibo	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	98%	PYMV
2004-03-20-04	Carrasquero	Mara	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2004-07-19-02	Agronomía, UCV	M. B. Iragorry	Aragua	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2004-09-24-03	Mocoy	La Plazuela	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2004-09-24-04	Mocoy	La Plazuela	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome seq	95%	PYMV

2004-09-25-02	Santiago	Trujillo	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	99%	PYMV
2004-09-25-03	Santiago	Trujillo	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequence	95%	PYMV
2004-10-10-01	Sabana de Parra	J. A. Páez	Yaracuy	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	95%	PYMV
2005-01-13-09	Juan de Mata Suarez	Anzoátegui	Cojedes	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	95%	PYMV
2005-01-14-01	Esc. Agr. Salesiana	Barinas	Barinas	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome seq	94%	PYMV
2005-01-14-02	Esc. Agr. Salesiana	Barinas	Barinas	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome seq	94%	PYMV
2005-01-17-01	Fuerte Tavacare	Barinas	Barinas	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	95%	PYMV
2005-01-17-02	Fuerte Tavacare	Barinas	Barinas	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2005-01-17-04	Fuerte Tavacare	Barinas	Barinas	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome seq	94%	PYMV
2005-01-17-05	Fuerte Tavacare	Barinas	Barinas	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	95%	PYMV
2005-01-25-01	La Vega	Boconó	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2005-01-25-02	La Vega	Boconó	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome seq	94%	PYMV
2005-06-04-03	Sara Linda	Rafael Rangel	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2005-06-04-05	Sara Linda	Rafael Rangel	Trujillo	1	1	Potato yellow mosaic virus (PYMV) DNA B, complete genome sequence	97%	PYMV
2008-11-17-03	El Mortero	A. E. Blanco	Lara	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2008-11-17-04	Lourdes	Morán	Lara	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2008-11-17-09	Lourdes	Morán	Lara	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	93%	PYMV
2009-02-04-02	Finca Maidelin	Miranda	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2009-02-04-04	Finca Maidelin	Miranda	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2009-04-03-02	La Calceta	Barinas	Barinas	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2009-04-03-03	La Calceta	Barinas	Barinas	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome sequ	94%	PYMV
2009-04-03-04	Cas. La Raya Abajo	Rojas	Barinas	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2009-05-07-02	Vivero Universitario	Maracaibo	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus-[Venezuela] DNA A, complete genome seq	94%	PYMV
2009-05-07-04	Vivero Universitario	Maracaibo	Zulia	1	1	Potato yellow mosaic virus segment DNA-A, complete sequence	94%	PYMV
2005-01-13-06	Casa de Teja	Anzoátegui	Cojedes	1	1	Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus segment DNA A	93%	RhGMVY

2004-11-13-03	Cas. La Doncella	Anzoátegui	Cojedes	1	1	Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus clone Desm-C6 segment DNA	93%	RhGMYV
2005-01-07-04	Las Carmelitas	Sucre	Zulia	1	1	Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus segment A	91%	ToMYLCAV
2005-01-07-05	Las Carmelitas	Sucre	Zulia	1	1	Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus segment A	91%	ToMYLCAV
2006-04-01-02	Altamira	Bolívar	Trujillo	1	1	Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus segment A	91%	ToMYLCAV
2005-01-24-01	UNELLEZ	Barinas	Barinas	1	1	Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus segment A, complete sequence	99%	ToMYLCAV
2003-12-07-05	Quibor	Jiménez	Lara	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes	94%	ToVEV
2004-12-03-02	Cruz de Taratara	Federación	Falcón	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes	94%	ToVEV
2005-01-13-08	Casa de Teja	Anzoátegui	Cojedes	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes	94%	ToVEV
2006-09-21-02	Campo Alegría	Vargas	Vargas	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes	94%	ToVEV
2006-12-13-01	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes	94%	ToVEV
2007-02-01-07	Fca. El Palo	Mara	Zulia	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes	94%	ToVEV
2007-03-16-01	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes	94%	ToVEV
2007-03-16-04	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	90%	ToVEV
2007-03-16-05	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes	94%	ToVEV
2007-03-16-08	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes	94%	ToVEV
2007-03-16-09	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes	94%	ToVEV
2007-07-27-04	Toico, Palo Gordo	Cárdenas	Táchira	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	93%	ToVEV
2007-07-28-02	El Japón vía Rubio	Junín	Táchira	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	94%	ToVEV
2007-07-30-02	Peribeca	Independencia	Táchira	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	94%	ToVEV
2001-04-16-02	UTF-LUZ	Maracaibo	Zulia	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	95%	ToVEV
2003-12-04-03	Guanayen	Camatagua	Aragua	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	95%	ToVEV
2003-12-04-05	Guanayen	Camatagua	Aragua	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	95%	ToVEV
2003-12-04-06	Guanayen	Camatagua	Aragua	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	95%	ToVEV
2003-12-04-08	Guanayen	Camatagua	Aragua	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	94%	ToVEV

2003-12-29-03	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	95%	ToVEV
2009-01-01-01	Río Cocollar	Acosta	Monagas	1	1	Venezuela tomato geminivirus AV1 and AC1 genes, partial cds	94%	ToVEV
2004-09-24-01	Mocoy	La Plazuela	Trujillo	1	1	Tomato yellow margin leaf curl virus segment DNA A, complete sequen	94%	ToYMLCV
2004-09-24-02	Mocoy	La Plazuela	Trujillo	1	1	Tomato yellow margin leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	94%	ToYMLCV
2004-11-13-04	Cas. La Doncella	Anzoátegui	Cojedes	1	1	Tomato yellow margin leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	94%	ToYMLCV
2007-12-23-01	Fca. B. Geraud	Payara	Portuguesa	1	1	Tomato yellow margin leaf curl virus segment DNA A, complete sequen	94%	ToYMLCV
2007-12-23-02	Fca. B. Geraud	Payara	Portuguesa	1	1	Tomato yellow margin leaf curl virus segment DNA A, complete sequen	94%	ToYMLCV
2007-12-23-05	Fca. B. Geraud	Payara	Portuguesa	1	1	Tomato yellow margin leaf curl virus segment DNA A, complete sequence	94%	ToYMLCV
2007-12-23-06	Fca. B. Geraud	Payara	Portuguesa	1	1	Tomato yellow margin leaf curl virus segment DNA A, complete sequenc	94%	ToYMLCV
2001-05-18-01	Caño San Andrés	Mara	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV-Mld
2006-07-12-01	San Gerónimo	Cocorote	Yaracuy	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2006-07-24-05	La Barinesa	Bolívar	Barinas	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2007-02-01-03	Fca. Luz Marina	Mara	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2007-02-01-04	Fca. Luz Marina	Mara	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2007-03-16-02	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2007-03-16-03	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2003-12-07-06	Quibor	Jiménez	Lara	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2003-12-29-01	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2003-12-29-02	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2006-04-11-03	Muchuche	Carache	Trujillo	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2000-12-27-01	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2004-12-11-01	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2004-12-10-01	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV
2004-12-11-04	La Cepeda	J. E. Lossada	Zulia	1	0	Tomato yellow leaf curl virus Portugal Mild – Japón Mild	98%	TYLCV

Anexo 2. Especies de begomovirus asociadas con Tomato yellow leaf curl disease. Se citan cepas de virus cuya secuencia completa de AND A esta disponible. Los nombres de las especies se escribieron con letra cursiva y el de los aislados y sus descriptores en letra romana. Se mencionan los números de accesoión y acrónimo en cada caso.

Especies de virus/ Cepas	ADN A	ADN B	Acrónimo
<i>Tomato yellow leaf curl Axarquia virus</i>			
Tomato yellow leaf curl Axarquia virus – [Spain:Algarrobo:2000]	AY227892		TYLCAxV-[ES:Alg:00]
<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>			
Tomato yellow leaf curl China virus – Bean [China:Yunnan:Bean:2004]	DQ256460		TYLCCNV-Bea[CN:Yn:Bea:04]
Tomato yellow leaf curl China virus – Baoshan1 [China:Yunnan 10:Tobacco:2000]	AJ319675		TYLCCNV-Bao1[CN:Yn10:Tob:00]
Tomato yellow leaf curl China virus – Baoshan2 [China:Yunnan 11:Tobacco:2000]	AJ319676		TYLCCNV-Bao2[CN:Yn11:Tob:00]
Tomato yellow leaf curl China virus – Chuxiong [China:Yunnan 25:Tomato:2000]	AJ457985		TYLCCNV-Chu[CN:Yn25:Tom:00]
Tomato yellow leaf curl China virus – Chuxiong [China:Yunnan 295:Tobacco:2005]	AM260703		TYLCCNV-Chu[CN: Yn295:Tob:05]
Tomato yellow leaf curl China virus – Dali [China:Yunnan 8:Tobacco:1999]	AJ319677		TYLCCNV-Dal[CN:Yn8:Tob:99]
Tomato yellow leaf curl China virus – Dali [China:Yunnan 43:Tobacco:2001]	AJ781302		TYLCCNV-Dal[CN:Yn43:Tob:01]
Tomato yellow leaf curl China virus – Dali [China:Yunnan 5:Tobacco:1999]	AJ319674		TYLCCNV-Dal[CN:Yn5:Tob:99]
Tomato yellow leaf curl China virus – Datura [China:Yunnan 72:Datura:2005]	EF011559		TYLCCNV-Dat[CN:Yn72:05]
Tomato yellow leaf curl China virus – Honghe [China:Guangxi 102:2004]	AM050555		TYLCCNV-Hon[CN:Gx102:04]
Tomato yellow leaf curl China virus – Honghe [China:Guangxi]	AF311734		TYLCCNV-Hon[CN:Gx]
Tomato yellow leaf curl China virus – Honghe [China:Yunnan 231:Tobacco:2005]	AM260701		TYLCCNV-Hon[CN:Yn231:Tob:05]
Tomato yellow leaf curl China virus – Honghe [China:Yunnan 244:Tobacco:2005]	AM260702		TYLCCNV-Hon[CN:Yn244:Tob:05]
Tomato yellow leaf curl China virus – Honghe [China:Yunnan 322:Solanum:2005]	AM181683		TYLCCNV-Hon[CN:Yn322:Sol:05]
Tomato yellow leaf curl China virus – Honghe [China:Yunnan 36:Tobacco:2001]	AJ420316		TYLCCNV-Hon[CN:Yn36:Tob:01]
Tomato yellow leaf curl China virus – Honghe [China:Yunnan 38:Tobacco:2001]	AJ420317		TYLCCNV-Hon[CN:Yn38:Tob:01]
Tomato yellow leaf curl China virus – Honghe [China:Yunnan 64:Siegesbeckia:2001]	AJ457823		TYLCCNV-Hon[CN:Yn64:Sie:01]
<i>Tomato yellow leaf curl Guangdong virus</i>			
Tomato yellow leaf curl Guangdong virus – [China:Guangzhou 3:2003]	AY602166		TYLCGuV-[CN:Gz3:03]
<i>Tomato yellow leaf curl Indonesia virus</i>			
Tomato yellow leaf curl Indonesia virus – [Indonesia:Lembang:2005]	AF189018	AF511528	TYLCKaV-[ID:Lem:05]

Especies de virus/ Cepas	ADN A	ADN B	Acrónimo
<i>Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus</i>			
Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus – [Thailand:Kanchanaburi 1:2001]	AF511529	AF511528	TYLCKaV-[TH:Kan1:01]
Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus – [Thailand:Kanchanaburi 2:Eggplant:2001]	AF511530	AF511527	TYLCKaV-[TH:Kan2:Egg:01]
Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus – [Vietnam:Binhuong:Eggplant:2005]	DQ641702		TYLCKaV-[VN:Bin:Egg:05]
Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus – [Vietnam:2005]	DQ169054	DQ169055	TYLCKaV-[VN:05]
<i>Tomato yellow leaf curl Malaga virus</i>			
Tomato yellow leaf curl Malaga virus – [Spain:421:1999]	AF271234		TYLCMaV-[ES:421:99]
<i>Tomato yellow leaf curl Mali virus</i>			
Tomato yellow leaf curl Mali virus – Ethiopia [Ethiopia:Melkassa:2005]	DQ358913		TYLCMLV-ET[ET:Mel:05]
Tomato yellow leaf curl Mali virus – Mali [Mali:2003]	AY502934		TYLCMLV-ML[ML:03]
<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>			
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Sardinia [Italy:Sardinia:1988]	X61153		TYLCSV-Sar[IT:Sa:88]
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Sicily [Italy:Sicily]	Z28390		TYLCSV-Sic[IT:Sic]
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Sicily [Israel:Rehovot:2005]	DQ845787		TYLCSV-Sic[IL:Reh:05]
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Sicily [Tunisia:Bkalta 3:2002]	AY736854		TYLCSV-Sic[TN:Bka3:02]
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Spain [Morocco:Agadir:2002]	AY702650		TYLCSV-ES[MA:Aga:02]
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Spain [Spain:Almeria 2:1992]	L27708		TYLCSV-ES[ES:Alm2:92]
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Spain [Spain:Canary]	AJ519675		TYLCSV-ES[ES:Can]
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Spain [Spain:Murcia 1:1992]	Z25751		TYLCSV-ES[ES:Mur1:92]
<i>Tomato yellow leaf curl Thailand virus</i>			
Tomato yellow leaf curl Thailand virus – A [Thailand:1]	X63015	X63016	TYLCTHV-A[TH:1]
Tomato yellow leaf curl Thailand virus – A [Thailand:2]	AF141922	AF141897	TYLCTHV-A[TH:2]
Tomato yellow leaf curl Thailand virus – B [China:Yunnan 72:2002]	AJ495812		TYLCTHV-B[CN:Yn72:02]
Tomato yellow leaf curl Thailand virus – B [Myanmar:Yangon:1999]	AF206674		TYLCTHV-B[MM:Yan:99]
Tomato yellow leaf curl Thailand virus – B [Thailand:Chiang Mai]	AY514630	AY514633	TYLCTHV-B[TH:ChMai]
Tomato yellow leaf curl Thailand virus – B [Thailand:Nong Khai]	AY514631	AY514634	TYLCTHV-B[TH:NoK]
Tomato yellow leaf curl Thailand virus – C [Thailand:Sakon Nakhon]	AY514632	AY514635	TYLCTHV-C[TH:SaNa]
<i>Tomato yellow leaf curl Vietnam virus</i>			
Tomato yellow leaf curl Vietnam virus – [Vietnam:Hanoi:2005]	DQ641697		TYLCVNV-[VN:Han:05]

Especies de virus/ Cepas	ADN A	ADN B	Acrónimo
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>			
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [China:Shangai 2:2005]	AM282874		TYLCV-IL[CN:SH2:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Cuba]	AJ223505		TYLCV-IL[CU]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Dominican Republic]	AF024715		TYLCV-IL[DO]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Egypt:Ismaelia]	AY594174		TYLCV-IL[EG:ism]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Egypt:Nobarria:1991]	EF107520		TYLCV-IL[EG:Nob:91]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Israel:Rehovot:1986]	X15656		TYLCV-IL[IL:Reo:86]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Italy:Sicily:2004]	DQ144621		TYLCV-IL[IT:Sic:04]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Japan:Haruno:2005]	AB192966		TYLCV-IL[JR:Han:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Japan:Misumi:Stellaria]	AB116631		TYLCV-IL[JR:Mis:Ste]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Japan:Miyazaki]	AB116629		TYLCV-IL[JR:Miy]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Japan:Omura:Eustoma]	AB116630		TYLCV-IL[JR:Omu:Eus]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Japan:Omura:Ng]	AB110217		TYLCV-IL[JR:Omu:Ng]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Japan:Tosa:2005]	AB192965		TYLCV-IL[JR:Tos:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Jordan:Tomato:2005]	EF054893		TYLCV-IL[JO:Tom:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Lebanon:Tomato:2005]	EF051116		TYLCV-IL[LB:Tom:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Mexico:Culiacan:2005]	DQ631892		TYLCV-IL[MX:Cul:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Morocco:Berkane:2005]	EF060196		TYLCV-IL[MO:Ber:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Puerto Rico:2001]	AY134494		TYLCV-IL[PR:01]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Spain:Almeria:Pepper:1999]	AJ489258		TYLCV-IL[ES:Alm:Pep:99]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Tunisia:2005]	EF101929		TYLCV-IL[TN:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [Turkey:Mersin:2005]	AJ812277		TYLCV-IL[TR:Mer:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Israel [United States of America:Florida:1997]	AY530931		TYLCV-IL[USA:Flo]
Tomato yellow leaf curl virus – Gezira [Sudan:1996]	AY044138		TYLCV-Gez[SD:96]
Tomato yellow leaf curl virus – Iran [Iran:Iranshahr:1998]	AJ132711		TYLCV-IR[IR:Ira:98]
Tomato yellow leaf curl virus – Oman [Oman:Al-Batinah:2005]	DQ644565		TYLCV-OM[OM:Alb:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Israel:1993]	X76319		TYLCV-Mld[IL:93]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Japan:Aichi]	AB014347		TYLCV-Mld[JR:Aic]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Japan:Aichi2:2003]	DD033365		TYLCV-Mld[JR:Aic2:03]

Especies de virus/ Cepas	ADN A	ADN B	Acrónimo
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Japan:Atumi]	AB116633		TYLCV-Mld[JR:Atu]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Japan:Daito]	AB116635		TYLCV-Mld[JR:Dai]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Japan:Kisozaki]	AB116634		TYLCV-Mld[JR:Kis]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Japan:Osuka]	AB116636		TYLCV-Mld[JR:Osu]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Japan:Shimizu]	AB110218		TYLCV-Mld[JR:Shi]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Japan:Shizuoka]	AB014346		TYLCV-Mld[JR:Shz]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Japan:Yaizu]	AB116632		TYLCV-Mld[JR:Yai]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Jordan:Cucumber:2005]	EF158044		TYLCV-Mld[JO:Cuc:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Jordan:Homra:2003]	AY594175		TYLCV-Mld[JO:Hom:03]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Jordan:Tomato:2005]	EF054894		TYLCV-Mld[JO:Tom:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Lebanon:LBA44:05]	EF185318		TYLCV-Mld[ILB;LBA44:05]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Portugal:2:1995]	AF105975		TYLCV-Mld[PT:2:95]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Reunion:2002]	AJ865337		TYLCV-Mld[RE:02]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Spain:72:1997]	AF071228		TYLCV-Mld[ES:72:97]
Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Spain:Almeria:1999]	AJ519441		TYLCV-Mld[ES:Alm:99]

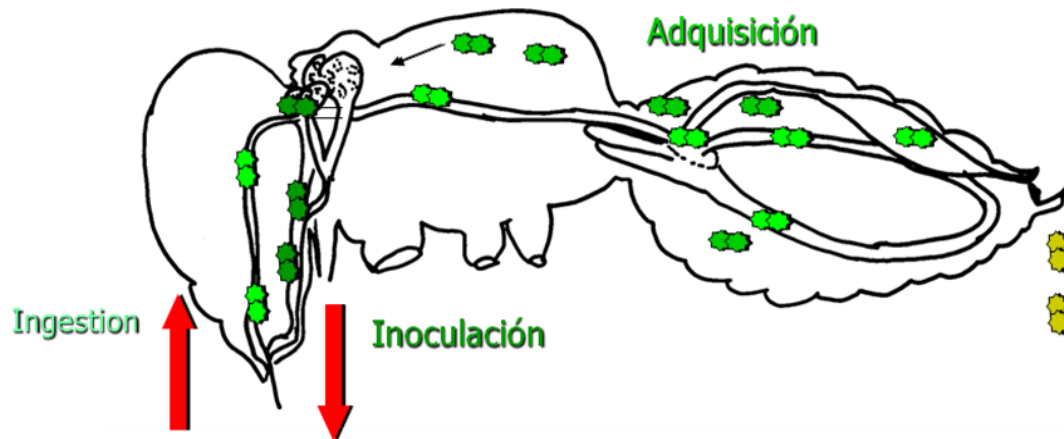
Fuente: *Geminiviridae* Study Group, International Committee on Taxonomy of Viruses (Moriones y Navas Castillo, 2010)



Anexo 3. Mapa político de Venezuela



Anexo 4. Mapa político del estado Zulia, Venezuela.



Anexo 5. Diagrama del movimiento circulatorio – no propagativo del begomovirus en *Bemisia tabaci* (Gennadius)



Anexo 6. Mantenimiento de colonias de *Bemisia tabaci* virulíferas en plantas de tomate.



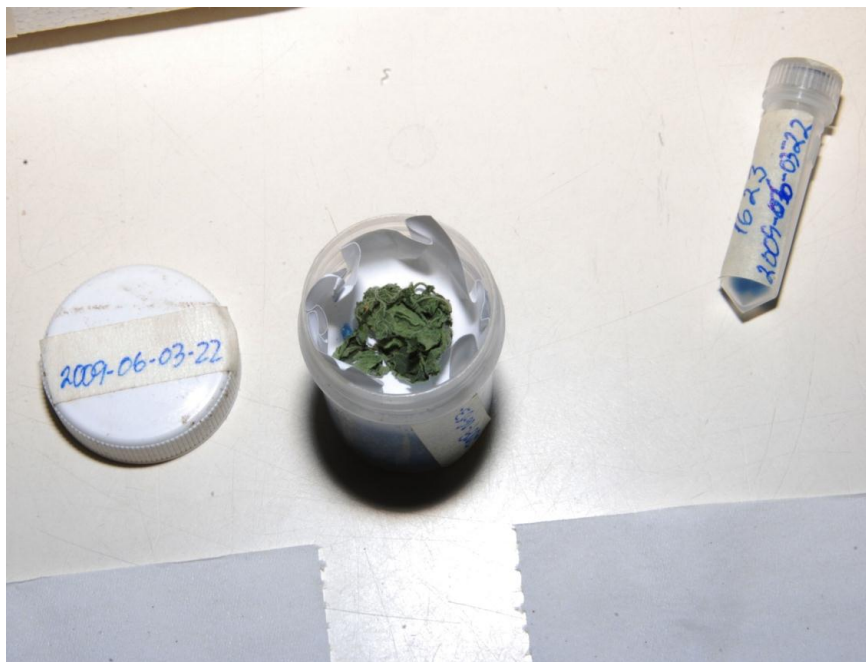
Anexo 7. Inoculación de las plántulas con TYLCV mediante *Bemisia tabaci*



Anexo 8. Plantas inoculadas con TYLCV, trasplantadas a macetas y colocadas en jaulas-umbraculo.



Anexo 9. Jaulas-umbraculo fabricadas con estructura de aluminio y malla anti-áfido, suspendidas en mesones de hierro.



Anexo 10. Frasco para desecar las muestras y tubo para almacenarlas una vez desecadas.

Anexo 11. Abreviaturas y su significado

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADN-A y ADN-B:	Componentes de los begomovirus con genoma bipartito.
BCTV:	Beet curly top virus
BGMV:	Bean golden mosaic virus
CP:	Proteína de la cápside (ADN-A)
CR:	Región común (ADN-A)
dNTP:	desoxirribonucleósido-trifosfato
DPI:	Días postinoculación de un virus a una planta
GenBank:	Banco de genes
GLM:	Modelo lineal general estadístico
HRG:	Tomate híbrido Río Grande
HRO:	Tomate híbrido Río Orinoco
ICTV:	Comité internacional para la taxonomía de virus
LSMEANS:	Método estadístico de los mínimos cuadrados
MeMV:	Merremia mosaic virus
MP:	Proteína del movimiento (ADN-B)
MSV:	Maize streak virus
NCBI:	Centro Nacional para la Información de la Biotecnología
NSI:	Identidad de la secuencia nucleotídica
NSP:	Proteína nuclear Shutlling (ADN-B)
ORF:	Marco abierto de lectura a la secuencia de ADN entre un codón de inicio de la traducción y un codón de terminación
PAA:	Período de acceso para la adquisición de un virus por el insecto vector
PAI:	Período de acceso para la inoculación que requiere un insecto vector
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa

PYMV:	Potato yellow mosaic virus
REn:	Proteína que incrementa la replicación (ADN-A)
Rep:	Proteína asociada a la replicación (ADN-A)
RhGMYuV:	Rhyncosia golden mosaic Yucatan virus
ToCLDV:	Tomato chlorotic leaf distortion virus
ToMYLCAV:	Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus
ToMYV:	Tomato yellow mosaic virus
ToVeV:	Tomato Venezuela virus
TPTV:	Tomato pseudocurly top virus
TrAP:	Proteína activadora de la transcripción (ADN-A)
TYLCAxV:	Tomato yellow leaf curl Axarquia virus
TYLCCNV:	Tomato yellow leaf curl China virus
TYLCD:	Tomato yellow leaf curl diseases
TYLCGuV:	Tomato yellow leaf curl Guangdong virus
TYLCIDV:	Tomato yellow leaf curl Indonesia virus
TYLCKaV:	Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus
TYLCMaIV:	Tomato yellow leaf curl Malaga virus
TYLCMLV:	Tomato yellow leaf curl Mali virus
TYLCSV:	Tomato yellow leaf curl Sardinia virus
TYLCTHV:	Tomato yellow leaf curl Thailand virus
TYLCV:	Tomato yellow leaf curl virus
TYLCV-MId:	Tomato yellow leaf curl virus, cepa Mild
TYLCVNV:	Tomato yellow leaf curl Vietnam virus
TYMLCV:	Tomato yellow margin leaf curl virus
VRG:	Tomate Variedad Río Grande