

MINISTERIO DE LA AGRICULTURA
Instituto de investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”

Obtención de líneas de tomate resistentes al virus del
encrespamiento amarillo de las hojas del tomate (TYLCV)
en Cuba

Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias
Agrícolas

Autora: Msc. Mayté Piñón Gómez
Tutor: Dra. María Teresa Cornide Hernández

La Habana, marzo 2009

SINTESIS

En el presente trabajo, se obtuvieron cuatro líneas de tomate, LD3, LD4, LD5 y LD6 resistentes al Virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*-Israel [Cuba]; TYLCV-IL [CU]), mediante el empleo de métodos tradicionales de selección y el diagnóstico molecular. La resistencia genética al TYLCV-IL [CU] en el tomate, en nuestras condiciones, se definió por: la supresión del desarrollo de los síntomas de la enfermedad; la reducción de la multiplicación viral y la ausencia de afectación significativa del rendimiento productivo.

Se realizó la genotipificación molecular de las líneas con marcadores tipo RFLP, (Restriction Fragment Length Polymorphism) con sondas ligadas al gen *Ty-1*, introgresado, proveniente de *Solanum chilense* LA1969; lo cual permitió diferenciar la presencia de al menos dos fuentes de resistencia al TYLCV-IL [CU].

En el trabajo se propone una metodología de evaluación de fuentes genéticas de tomate resistentes al TYLCV-IL [CU]. Una de las líneas, LD5, se liberó como variedad (Vyta); la cual mostró estabilidad e independencia de la aplicación de plaguicidas químicos. Se evaluaron las líneas LD ante el TYLCV-Mld [RE], en la isla Reunión, ubicada en el océano Índico.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) en el mundo tiene un rendimiento promedio de 28 toneladas por hectárea (t/ha). No todas las zonas geográficas logran altos resultados productivos. Mientras en EE.UU. y Canadá se alcanza un rendimiento promedio de 55 t/ha, en América Central y el Caribe se logra 20 t/ha (FAOSTAT, 2006). En Cuba, donde el tomate ocupa el 42% de la superficie destinada para la siembra de las hortalizas tradicionales, sólo se llega a 13 t/ha (Cardoza, 2007).

En los países tropicales, el tomate se cultiva en condiciones climáticas que limitan su desarrollo y bajo una alta incidencia de plagas y enfermedades (Gómez y col., 2000); entre ellas, los geminivirus transmitidos por mosca blanca, *Bemisia tabaci* y, en especial el Virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (Delatte, 2005; Caruana, 2007).

El mejoramiento genético para la resistencia a geminivirus en el tomate juega un papel muy importante en el manejo integrado de esta enfermedad, ya que el control químico del vector, es insuficiente y tiene una repercusión negativa en el medio ambiente (Palumbo y col., 2001).

Los programas de mejoramiento genético en el mundo se han basado en la transferencia de genes de resistencia presentes en las especies silvestres del género *Solanum* (Friedmann y col., 1998; Hanson y col., 2006; Ji y col., 2007). Entre ellos, el gen *Ty-1* ha sido introgresado en líneas de tomate, a partir de la especie *Solanum chilense* LA1969 (Zamir y col., 1994). La disponibilidad de marcadores moleculares

estrechamente ligados al mismo representa un objetivo importante en la mejora genética del cultivo (Pérez de Castro y col., 2007 b).

En Cuba, en la década del noventa, se identificaron tres especies de geminivirus en el cultivo del tomate: el TYLCV (González y Valdés, 1995); el Virus Taino del moteado del tomate (*Tomato mottle Taino virus*, ToMoTV) (Ramos y col., 1997) y el Virus Habana del mosaico del tomate (*Tomato mosaic Havana virus*, ToMHV) (Martínez y col., 1998). En el país no había antecedentes de trabajo en la mejora genética del tomate para la resistencia a geminivirus hasta 1992, cuando se comenzó en el Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova" (IIHLD) un programa de mejoramiento genético con este fin.

1.1. Hipótesis

El uso combinado de métodos tradicionales y moleculares en un programa de mejoramiento genético del cultivo del tomate para la resistencia a geminivirus, permite la obtención de líneas y variedades comerciales resistentes al TYLCV en Cuba.

1.2. Objetivo general

Obtener líneas y variedades comerciales de tomate resistentes al TYLCV a través del empleo de métodos tradicionales y moleculares, en un programa de mejoramiento genético.

1.3. Objetivos específicos

1. Obtener líneas de tomate portadoras de una fuente de resistencia genética al TYLCV proveniente de *S. chilense* LA1969.

2. Establecer una metodología de evaluación de la resistencia al TYLCV en las condiciones de Cuba.
3. Caracterizar las nuevas fuentes de resistencia obtenidas, mediante marcadores moleculares asociados al gen *Ty-1* proveniente de *S. chilense* LA1969 (genotipificación molecular).
4. Recomendar variedades comerciales y líneas resistentes al TYLCV en Cuba.

1.4. Novedad científica

1. Por primera vez se obtienen líneas de tomate cubanas resistentes al TYLCV y adaptadas al trópico. Estas líneas abren nuevas posibilidades para desarrollar la pirimidización de genes de resistencia al TYLCV. Ello implica un salto cuantitativo en los resultados del programa nacional de mejoramiento genético de este cultivo y su competitividad con programas internacionales en este tema.
2. Por primera vez se utilizan en Cuba genes de resistencia al TYLCV presentes en especies silvestres afines al tomate cultivado, en un programa de mejoramiento genético de esta especie y se realiza la caracterización molecular de las líneas obtenidas mediante el uso de marcadores moleculares tipo RFLP para comprobar la presencia del gen *Ty-1*.

1.5. Importancia práctica

1. Una de las líneas obtenidas, LD5, se generalizó como variedad, Vyta, resistente al TYLCV y productiva; la que ocupa actualmente el 38% de la siembra nacional y de la producción de semillas.

2. Empleo de los métodos moleculares en apoyo al programa de mejoramiento genético del tomate, ante la necesidad de obtener líneas y variedades comerciales resistentes al TYLCV en Cuba, de forma rápida y precisa.
3. Se recomienda una metodología de evaluación para la resistencia al TYLCV en las condiciones de Cuba.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. Origen, domesticación y taxonomía del tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., es una especie cultígena, resultante de una larga selección hecha por el hombre (Laterrot, 1989). Es originario de América del Sur y se informa que *S. lycopersicum* variedad *cerasiforme* es el ancestro más probable del tomate cultivado (Müller, 1940; Luckwill, 1943; Rick, 1978).

Un conjunto de hechos históricos, lingüísticos y arqueológicos, están a favor de México como centro de domesticación y lugar desde el cual se llevó el tomate al Viejo Mundo (Jenkins, 1948). En este proceso se logró, fundamentalmente, un aumento en el peso del fruto (Rick, 1976).

El tomate es un miembro de la familia *Solanaceae*. Inicialmente fue incluido por Linneaus en el género *Solanum*; sin embargo hasta el año 2005, se adoptó la clasificación propuesta por Miller desde 1754, en el género *Lycopersicon*.

Recientemente, el uso de técnicas moleculares reveló que los géneros *Solanum* y *Lycopersicon* son muy parecidos. El género *Lycopersicon* ha cambiado de categoría taxonómica y se incluye en la sección *Lycopersicon* dentro del género *Solanum* (Peralta y Spooner, 2005; Peralta y col., 2006) En la tabla 1 se muestra las correspondencias entre la nomenclatura de Miller y la clasificación actual.

Tabla 1. Especie cultivada y afines al tomate, nueva nomenclatura según Peralta y col., (2006) y clasificación anterior.

<i>Solanum</i>	<i>Lycopersicon</i>
<i>S. lycopersicum</i> L.	<i>L. esculentum</i> Miller
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	<i>L. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Miller
<i>S. cheesmaniae</i> (L.Riley) Fosberg	<i>L. cheesmaniae</i> L. Riley
<i>S. galapagense</i> S. Darwin y Peralta	Parte de <i>L. cheesmaniae</i> L. Riley (previamente conocida como var. <i>minor</i>)
<i>S. habrochaites</i> S.Knapp y D.M Spooner	<i>L. hirsutum</i> Dunal
<i>S. neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	<i>L. parviflorum</i> C.M.Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle
<i>S. chmielewskii</i> (C.M.Rick, Kesicki, Fobes y M.Holle) D.M. Spooner, G.J Anderson y R.K. Jansen	<i>L. chmielewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes y Holle
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>L. chilense</i> Dunal
<i>S. peruvianum</i> L.	<i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. corneliomuelleri</i> J.F. Macbr.	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller; también conocida como <i>L. glandulosum</i> C.F. Mull.
<i>S. arcanum</i> Peralta	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. huaylasense</i> Peralta y Knapp	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. pennellii</i> Correll	<i>L. pennellii</i> (Correll) D'Arcy

2.2. Especies silvestres afines al tomate cultivado

Las especies silvestres del género *Solanum*, afines al tomate cultivado, pueden encontrarse en una banda costera al oeste de América del Sur (3 200 kilómetros desde Ecuador hasta Chile), la que se extiende a una distancia de 80 kilómetros hacia el interior, en hábitats muy diferentes, desde el nivel del mar hasta una altitud de 3 300 metros en la cordillera de los Andes; incluye las Islas Galápagos (Darwin y col., 2003). Estas constituyen una fuente importante de variabilidad para la resistencia a enfermedades (Darwin y col., 2003; Shagardsky, 2006; Carravedo, 2006). Los genes de resistencia al TYLCV, presentes en *S. chilense*, se utilizan con éxito en los programas de mejoramiento genético del tomate cultivado (Scott, 2001; Gómez y col., 2004). Esta especie se localiza en la ladera oeste de los Andes desde el

Departamento de Tacna en el sur de Perú hasta el norte de Chile, en llanos rocosos muy áridos y desiertos costeros, desde el nivel del mar hasta los 2 000 metros sobre su nivel (Peralta y col., 2006) (figura 1).



Figura 1. En la parte superior de la figura se observa la especie *Solanum chilense* de frutos muy pequeños y verdes. En la parte inferior, se observa un fruto de la especie *S. lycopersicum*, grande y rojo. Cortesía del Dr. Peter Hanson, AVRDC, Taiwán.

2.3. Importancia nutritiva y terapéutica del tomate

Las vitaminas A y C están presentes en el fruto del tomate (Wagner, 2002) pero este no se encuentra entre las hortalizas de mayor contenido en compuestos nutricionales. Sin embargo, cuando se tiene en cuenta su preferencia y nivel de consumo a escala mundial, su contribución en vitaminas y minerales es importante (Rick, 1978).

En la actualidad, se le considera un alimento funcional o nutracéutico, ya que contiene compuestos que son beneficiosos para la salud humana, capaces de prevenir enfermedades, como el licopeno, uno de los carotenoides más potentes como antioxidante; su consumo se asocia a una disminución de los riesgos de contraer

cáncer pulmonar y prostático y enfermedades cardiovasculares (Easdown y Kalb, 2004). Este compuesto se encuentra en el tomate fresco pero también en los productos procesados, como el tomate deshidratado, pasta de tomate y en polvo (Candelas y col., 2005).

Recientes estudios indican que el consumo de cantidades adecuadas de hortalizas y frutas puede prevenir enfermedades crónicas en el organismo humano. En este sentido, se recomienda la ingestión de “5 al día” o “5 colores al día”, en lo cual el tomate posee un papel importante (Li, 2008).

Por las cualidades y preferencia de esta hortaliza, los programas de mejoramiento genético para la resistencia a enfermedades, tienen como objetivo proporcionar un producto más sano, al eliminar o disminuir las aplicaciones de plaguicidas químicos (Laterrot, 1989; Morales, 2006).

2.4. Problemática mosca blanca-geminivirus en el cultivo del tomate

Cerca de 200 enfermedades afectan al tomate a nivel mundial. Entre estas se encuentran los hongos, las bacterias y los virus, en especial los geminivirus transmitidos por mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Cuba, MINAGRI, 2002; Bernal, 2007).

2.4.1. *Bemisia tabaci*

La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: *Aleyrodidae*) fue descrita por primera vez en 1889 en Grecia (Gennadius, 1889) y había sido informada en diferentes regiones con otros nombres, hasta que Mound (1963) comprobó que las características morfológicas de la pupa, que son las utilizadas para los estudios taxonómicos, variaban según la morfología de la superficie de la hoja de sus plantas

hospederas, por lo que muchas de las especies antes descritas se convirtieron en sinónimos de *B. tabaci* (Bellow y col., 1994; Mound, 1963).

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

La importancia, distribución e incidencia de los geminivirus (transmitidos por moscas blancas), está directamente asociada con la distribución y dinámica poblacional de *B. tabaci* (Morales, 2006).

El ciclo biológico del insecto tiene cuatro estadios: huevo, ninfa, pupa o ninfa IV y adulto. A su vez, el estado de ninfa tiene tres estadios (I, II y III), mientras que el cuarto es la pupa. El primer estadio ninfal es móvil, lo cual facilita su desplazamiento sobre la superficie de la hoja, hasta que se fija en un sitio antes de pasar el siguiente, en que permanece inmóvil (sésil) por el resto de los estadios (Morales y col., 2006).

La hembra pone entre 2,5 y 7,1 huevos/día, existe una importante reducción al bajar la temperatura (Delatte, 2005).

La longevidad de los adultos es muy variable dependiendo de la planta y la temperatura. Los machos tienen una longevidad de unos 15 días a 28°C, mientras que en las hembras es de 30 días a 16°C (McAuslane, 2007).

La forma de reproducción es por partenogénesis arrenotóquica (huevos fecundados originan hembras, huevos sin fecundar originan machos). Los adultos se localizan, preferentemente, en el envés de las hojas (figura 2); en ellas, las hembras realizan la puesta. Los huevos son depositados de forma dispersa y pueden llegar a 300 de forma

individual. El rango de temperatura para su desarrollo está entre 16°C y 34°C (McAuslane, 2007).



Figura 2. Adultos de *Bemisia tabaci* en el envés de las hojas de una planta de tomate. Cortesía del Dr. Peter Hanson, AVRDC, Taiwán.

Los biotipos más difundidos son el A, originalmente en América; B, región comprendida por el noreste de África-Medio Este-Península Arábiga (Frohlich y col., 1999); y Q, localizado en la cuenca del mar Mediterráneo. En la década del noventa, el biotipo B, invadió el continente americano y se diseminó rápidamente, lo cual favoreció el desarrollo de nuevos problemas con geminivirus previamente desconocidos (Morales y Anderson, 2001; Varma y Malathi, 2003).

El biotipo B tiene una alta capacidad reproductiva, completa su desarrollo en el tomate, tiene mayor tolerancia al frío, puede soportar los períodos adversos y recuperar de inmediato sus poblaciones (Brown, 1994; Perring, 1996; Naranjo y col., 2004); además, se ha podido comprobar que es más eficiente en la transmisión de virosis (Hilje, 2003). En América Latina, el biotipo B ha desplazado al biotipo A en regiones agrícolas de importancia (Morales y col., 2005).

Particularmente en Cuba, en la segunda mitad de 1989, las poblaciones de *B. tabaci* se incrementaron abruptamente en el tomate y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Murguido y col., 2002) y otros cultivos como calabaza (*Cucurbita moschata*), pepino (*Cucumis sativus*), melón (*Citrullus lanatus*), col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) y berenjena (*Solanum melongena*) (Vázquez y col., 1995).

Las principales enfermedades observadas fueron la del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) y la del mosaico dorado amarillo del frijol (BGMV) (González y Valdés, 1995). En 1992, las pérdidas llegaron al 42% del área cultivada de tomate en el territorio nacional (Vázquez y col., 1995). De igual forma, se determinó en Cuba que en el caso del TYLCV, la progresión de la enfermedad presentó una tendencia exponencial en el tiempo, con una marcada crisis entre la sexta y la séptima semana después del trasplante.

Estudios conducidos en Cuba durante los primeros años de incidencia del complejo mosca blanca-geminivirus (Vázquez, 1995), permitieron comprobar la existencia de al menos dos biotipos. Resultados recientes plantean la dominancia de las poblaciones del biotipo B en el Caribe, comparado con las poblaciones indígenas (Peterschmitt, 2007).

Las estrategias de manejo deben ser de naturaleza múltiple y basadas en la comprensión del patosistema en cuestión (Hilje, 2004; Kumar, 2005; Caruana, 2007; Martínez, 2007), por ello se recurre al Manejo Integrado de Plagas (MIP), como alternativa promisorio (Vázquez y col., 2006).

En la región del Caribe, a partir de encuestas en áreas tomateras, donde se valoraron todos los posibles elementos de control del vector, se desarrolló un modelo epidemiológico para estudiar el progreso de dichas enfermedades y la dinámica de las poblaciones de *B. tabaci* dentro del cultivo del tomate, el cual permite una nueva comprensión de los efectos de diferentes elementos de control (Muñiz y col., 2006; Holt y Chancellor, 2007).

Los resultados finales de un proyecto internacional sobre “Manejo de enfermedades producidas por geminivirus para la producción sostenible de tomate en el Caribe”, llevado a cabo entre los años 2002 y 2006, el cual incluyó a Cuba, República Dominicana, Trinidad-Tobago, Guadalupe y Martinica, señalan que el uso de una variedad resistente al patógeno, brinda una solución para la producción de tomate en áreas infectadas por los geminivirus (Caruana, 2007; Gómez, 2007).

2.4.2. Geminivirus

Los geminivirus son virus de plantas que pertenecen a la familia *Geminiviridae* y se caracterizan por presentar genomas de una o dos cadenas sencillas de ADN circular. Los genomas están empaquetados en dos partículas gemelas. La familia *Geminiviridae* está dividida en cuatro géneros, que se clasifican en función de la organización del genoma, la planta hospedera y el insecto vector (van Regenmortel y col., 2000) (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la familia *Geminiviridae*.

Género	Organización del genoma	Planta hospedera	Insecto vector
Mastrevirus	Monopartito	Monocotiledóneas	salta hojas (Homoptera: <i>Cicadellidae</i>)
Curtovirus	Monopartito	Dicotiledóneas	salta hojas (Homoptera: <i>Cicadellidae</i>)
Topocuvirus	Monopartito	Dicotiledóneas	salta árboles (<i>Microtalalis malleifera</i> Fowler)
Begomovirus	Bipartito, con excepciones, Monopartito	Dicotiledóneas	<i>Bemisia tabaci</i>

En el género Begomovirus se agrupan los geminivirus. La mayoría de sus miembros contienen genomas bipartitos designados como ADN A y ADN B. El TYLCV pertenece a este género y presenta un genoma monopartito, ADN A (van Regenmortel y col., 2000).

En la naturaleza, *B. tabaci* transmite el TYLCV de forma persistente circulativa, el virus es retenido durante la vida del insecto adulto después de la adquisición, y circula en su cuerpo desde las glándulas salivares. Sin embargo, la eficiencia en la transmisión declina con el tiempo. La transmisión óptima se establece después de un tiempo de adquisición de 16-24 horas seguido de un período de inoculación de 20-24 horas (Cohen y Harpaz, 1964).

Las ninfas son tan eficientes en la adquisición del virus como los adultos (Caciagli y col., 2000); sin embargo, se ha informado una disminución de la eficiencia en la transmisión con la edad del insecto (Rubinstein y Czosnek, 1997). Ghanim y

Czosnek., (2000) observaron la transmisión transovárica del TYLCV en, al menos, dos generaciones del biotipo B de *Bemisia*.

Tradicionalmente, los virus son clasificados teniendo en cuenta el hospedero, los síntomas producidos y su origen geográfico, pero en el caso de los begomovirus, diferentes especies causan síntomas similares en el mismo cultivo o infectan el mismo cultivo en la misma región geográfica. Esta complejidad se incrementa debido a la recombinación entre especies de begomovirus y la emergencia de nuevos virus de la familia *Geminiviridae* (Padidam y col., 1999; Nakhla y col., 2005). Consecuentemente, Fauquet y col., (2000) propusieron un sistema de nomenclatura que tiene en cuenta el nombre de la especie y la raza. No hay una clasificación oficial para esta última, pero se aplica para los virus que pertenecen a la misma especie pero poseen diferencias biológicas, serológicas y moleculares estables y heredables; los aislados corresponden a una zona geográfica específica. En el presente trabajo de tesis se utiliza esta nomenclatura.

Se han descrito más de 35 begomovirus que infectan el tomate (Fauquet y col., 2003).

La recombinación entre ellos ha contribuido a su diversidad y continuará siendo un factor en la evolución de estos virus (Fauquet y col., 2005; Kon y col., 2006)

El TYLCV se considera una especie de begomovirus; éste fue descrito por primera vez en Israel (Cohen y Nitzany, 1966). La infección en plantas susceptibles resulta en una clorosis, hojas en forma de cuchara, encrespamiento, caída de las flores y enanismo. En dependencia del momento de la infección, en cultivares susceptibles ocurren las pérdidas en el rendimiento, las que pueden llegar a ser del 100% (Lapidot y Friedmann, 2002).

Previo a 1990, el TYLCV no se conocía en el hemisferio occidental (Rojas y *col.*, 2004). Su incidencia se incrementó considerablemente en el período 1990-1996 (Czosnek y Laterrot, 1997). Este fue uno de los eventos más importantes en la historia de los begomovirus en América Latina y el Caribe (Polston y *col.*, 2004; Morales, 2006).

La introducción de plántulas infectadas de tomate provenientes de Israel, se informó como la posible causa de la llegada del TYLCV a República Dominicana (Polston y *col.*, 1994; Polston y Anderson, 1997). El virus se diseminó rápidamente en la Isla y la producción de tomate para procesamiento industrial colapsó.

En la región del Caribe, el TYLCV llegó también a Jamaica, Guadalupe y Puerto Rico (McGlashan y *col.*, 1994; Urbino y Tassius, 1999; Bird y *col.*, 2001). En México, se informó en la península de Yucatán en 1997 (Ascencio-Ibáñez y *col.*, 1999). El TYLCV fue detectado por primera vez en los Estados Unidos, en el estado de Florida, en 1997; en Georgia en 1998; Luisiana en 2000 y en Mississippi y Carolina del Norte en 2001 (Polston y *col.*, 1999; Pappu y *col.*, 2000; Ingram y Henn, 2001; Valverde y *col.*, 2001 y Polston y *col.*, 2002).

En Cuba, el TYLCV predomina en dicho cultivo con un porcentaje de infección por encima del 80% y desplazó a los dos begomovirus bipartitos identificados posteriormente (Martínez y *col.*, 2003; Martínez y *col.*, 2006). Trabajos que se realizaron en República Dominicana, Jamaica, sur de los EE.UU. y España, mostraron el predominio del TYLCV sobre los virus endémicos (Salati y *col.*, 2002). El TYLCV presente en Cuba, denominado TYLCV-IL [CU], muestra un 98% de homología con el TYLCV de Israel (Martínez y *col.*, 1998).

En lugares tan distantes como la isla de Madagascar, Mayote y Reunión, ubicadas en el océano Índico, se evidenciaron síntomas de encrespamiento y enanismo en plantas de tomate, característicos de los begomovirus (Delatte y col., 2003). En la isla Reunión se informó el *Tomato yellow leaf curl virus -Mild* (suave), TYLCV-Mld [RE], en 1997 (Peterschmitt y col., 1999).

Fauquet y col., (2008) propusieron un criterio de demarcación y una guía para clasificar los begomovirus por debajo del nivel taxonómico de especie, teniendo en cuenta la comparación de secuencias de pares de bases. Estos autores establecieron para el nivel de raza una identidad entre el 85 y 94%. En consecuencia con ello, el TYLCV-Mld presenta un 93% de homología con el TYLCV-IL (Delatte, 2005).

2.5. Mejoramiento genético del tomate

Los trabajos de investigación sobre la búsqueda de fuentes de resistencia a enfermedades en el tomate se desarrollaron desde los años 1940, inicialmente en los EE.UU. y después en Europa. En el transcurso de los años sesenta se obtuvieron las primeras variedades mejoradas mediante la introgresión de genes de especies silvestres, las cuales presentaban uno o varios genes de resistencia (Laterrot, 2002).

Todas las especies afines al tomate cultivado tienen igual número de cromosomas ($2n=24$). Este se cruza fácilmente con las especies silvestres, salvo con *S. peruvianum* y *S. chilense*, en las que es necesario recurrir al rescate de embriones *in vitro* (Gómez y col., 2000).

En el Caribe, el tomate se cultiva en ambientes muy diversos, el número de agentes patógenos que lo afectan es muy elevado; no obstante más de una docena de enfermedades poseen control por la vía genética, la mayoría monogénico dominante.

Su eficiencia es variable, ya sea por el nivel de expresión de la resistencia o por su estabilidad (Laterrot, 2002).

A nivel mundial, se desarrollan programas de mejoramiento con el objetivo de introducir en los cultivares genes de resistencia a enfermedades aún no controladas genéticamente, o a razas nuevas de agentes patógenos. Paralelamente, los seleccionadores tratan de acumular el máximo de resistencias, ya conocidas y utilizadas, conjuntamente con características agronómicas, de calidad de los frutos y adaptación climática. (AVRDC, 2002).

En los países tropicales y subtropicales, la tolerancia del tomate al calor en condiciones húmedas constituye un objetivo fundamental de la mejora (Laterrot, 1989; Nuez, 1995; AVRDC, 2004); ya que en los mismos es difícil encontrar la temperatura promedio óptima para el desarrollo del cultivo (21 a 24°C).

En los programas de mejoramiento genético del tomate en Cuba, se ha tenido en cuenta la creación de cultivares con tolerancia al calor y con alto potencial productivo (Mukandama, 2005; Florido, 2007).

Numerosos autores a nivel mundial concuerdan en la necesidad de ensayar genotipos promisorios en condiciones ambientales diferentes para una mejor evaluación de sus potencialidades, adaptación y estabilidad (Zavala-García y Eastin, 1992; AVRDC, 2004).

La calidad del fruto es un criterio complejo en el que intervienen aspectos internos y externos del fruto, tales como sabor, aroma y textura, los que están influenciados por el ambiente (Causse, 2007). El gusto del tomate ha pasado a ser un objetivo fundamental de la mejora de esta especie; en la actualidad se han identificado

marcadores moleculares para la selección de genotipos de interés agronómico (Angosto, 2005; Cebolla-Cornejo y *col.*, 2005).

Casi todos los cultivares de tomate existentes hoy día han sido desarrollados por los métodos clásicos de mejora de plantas autógamas, aunque cada vez más se utilizan híbridos F₁ (Gómez y *col.*, 2004).

A partir de 1970, los híbridos F₁ han ido reemplazando a las variedades del tipo línea pura en esta especie, tanto para el consumo en fresco como para el procesamiento industrial. Estos son apreciados por sus diversas características agronómicas, estabilidad, plasticidad y posibilidad de combinar diversos caracteres de interés en un solo genotipo (Georgiev, 1991).

2.5.1. Resultados del mejoramiento genético del tomate en Cuba

La creación de nuevos cultivares ha requerido de un esfuerzo sostenido por parte de los investigadores cubanos. El ingeniero Ismael Cueto fomentó la creación de una colección de germoplasma en el cultivo del tomate bajo el asesoramiento del doctor Julián Acuña, distribuyéndola por familias o grupos de líneas provenientes de diferentes cruzamientos o de grupos de selección que llegaron a tener hasta 11 000 líneas en 1968. Una colección heredera de este trabajo se conserva en el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), con más de 500 accesiones (Ortiz y *col.*, 2006).

En 1971, en el Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova" (IIHLD) se inició el trabajo de mejoramiento genético de esta especie. El propósito era proponer cultivares más productivas, basado en la introducción de variedades. En 1975 se adoptaron los métodos de hibridación y selección; los objetivos de trabajo fueron la

adaptación al trópico húmedo, tolerancia a los patógenos de mayor incidencia, calidad del fruto y rendimiento (Ortiz y col., 2006).

El Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), desde 1976 ha desarrollado programas de mejora genética por hibridación, mutación, variación somaclonal y selección.

En Cuba, el número de frutos por planta ha sido mejorado, fundamentalmente, para elevar el potencial productivo, ya que es uno de los componentes del rendimiento; en consecuencia, se han liberado a la producción las variedades Amalia y Mariela (Álvarez y col., 1997); Mara (Moya y col., 2003) y Lignon (Gómez y col., 2000), entre otras. LeMing Hong (1992) plantea que este carácter es de gran ayuda en la identificación de cultivares tolerantes al calor.

2.5.2. Resultados del mejoramiento genético del tomate para la resistencia a begomovirus a nivel mundial

En Israel, Cohen y Nitzany (1966) estudiaron la resistencia al TYLCV en un amplio rango de hospederos e informaron que *S. pimpinellifolium* y *S. peruvianum* no mostraban síntomas de la enfermedad; sin embargo, estos autores no indicaron las accesiones del material empleado.

Pilowsky y Cohen (1973) estudiaron una progenie proveniente del cruzamiento entre *S. lycopersicum* por *S. pimpinellifolium*, LA121. Los datos obtenidos a partir de las poblaciones F₂, F₃ y las retrocruzas en segregación, inoculadas mediante el vector *B. tabaci*, indicaron que la resistencia al TYLCV era incompletamente dominante y estaba controlada por un solo gen. Pérez de Castro y col., (2007a), por su parte,

estudiaron la herencia de la resistencia al TYLCV en accesiones provenientes de *S. pimpinellifolium*.

La accesión LA1478 de *S. pimpinellifolium* mostró resistencia en Sudán (Geneif, 1984) y en Jordania (Kasrawi y col., 1988). Posteriormente, se informó un control monogénico dominante para la resistencia en Hirsute y LA1478 (Kasrawi, 1989).

A partir de un cruzamiento entre plantas de *S. lycopersicum* por *S. pimpinellifolium* Hirsute-INRA y LA1478, se creó la población PIMPERTYLC, la cual fue seleccionada en diferentes países (Laterrot y Moretti, 1994).

La resistencia al TYLCV se evaluó en otras especies silvestres como *S. peruvianum*, ya que las líneas mejoradas derivadas de *S. pimpinellifolium* LA121 presentaban bajo vigor y rendimiento. Como resultado del trabajo, se informó que varios genes recesivos estaban asociados con la tolerancia al TYLCV en plantas procedentes de la accesión PI26935 de *S. peruvianum* y se logró el primer cultivar comercial tolerante, TY20 (Pilowsky y Cohen, 1990; 2000).

A partir de cruzamientos entre *S. lycopersicum* por *S. peruvianum* (PI126926, PI126930, PI390681 y LA441) se obtuvo una línea denominada TY172, con alto nivel de resistencia al TYLCV, en el Centro Volcani de Israel (Friedmann y col., 1998). Por su parte, Lapidot y col., (1997) obtuvieron la línea TY197, seleccionada para la resistencia al TYLCV en Marruecos.

La utilización de *S. habrochaites* LA 1777 y LA386 dio como resultado dos líneas tolerantes al TYLCV, 902 y 908 (Vidavsky y Czosnek, 1998).

Zamir y col., (1994) informaron resistencia al patógeno en *S. chilense* LA 1969. En otras accesiones de *S. chilense* (LA1932, LA2779 y LA1938) se informó un alto nivel

de resistencia al TYLCV y al Virus del moteado del tomate [*Tomato mottle virus* (ToMoV)], begomovirus bipartito existente en Florida, EE.UU. (Scott y Schuster, 1991; Scott, 2001).

En Brasil, un estudio genético en una línea derivada de Tyking, híbrido comercial de la firma Royal Sluis de Holanda, reveló que la resistencia al Virus del moteado clorótico del tomate [*Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV)], begomovirus bipartito, está condicionada por un gen recesivo, nombrado tentativamente *tcm-1* (Giordano y col., 2005).

En India, Kalloo y Banerjee (1990) obtuvieron seis líneas de tomate resistentes al TYLCV, derivadas de *S. habrochaite* f. *glabratum* accesión B6013. Una de estas líneas, H24, mostró alto nivel de resistencia al TYLCV en Taiwán y el sur de la India. Vidavski y col., (2006) plantean que los genes de resistencia presentes en las especies silvestres afines al tomate cultivado pueden utilizarse con éxito para la creación de cultivares resistentes.

2.5.3. Aplicación de los marcadores moleculares en apoyo al mejoramiento para la resistencia a begomovirus en el tomate

Los marcadores moleculares le han añadido una nueva y poderosa dimensión a la caracterización de germoplasma y al manejo de los recursos genéticos con vistas a la mejora (Cornide y col., 2000).

En el tomate, existe un mapa de unión de alta densidad molecular que comprende más de 1 000 marcadores de tipo RFLP, estos han sido mapeados sobre los 12 pares de cromosomas de la especie (Tanksley y col., 1992).

El mapeo y desarrollo de marcadores de genes de resistencia a begomovirus en el tomate facilita el logro de niveles superiores de resistencia, así como a un mayor rango de begomovirus (Hanson y col., 2006).

Zamir y col., (1994) fueron los primeros en informar el mapeo de un gen de resistencia a begomovirus. Una línea susceptible de *S. lycopersicum* se utilizó como progenitor femenino en un cruzamiento interespecífico con *S. chilense* LA1969. De un total de 300 flores polinizadas, sólo se logró una planta híbrida. El análisis con marcadores RFLP en las progenies obtenidas mediante retrocruzamientos y autofecundaciones posteriores, reveló que un gen incompletamente dominante, *Ty-1*, sobre el cromosoma 6, era el mayor responsable de la resistencia. Este gen fue mapeado cerca de los marcadores TG297 y TG97, este último el más cercano. Posteriormente, la Universidad Hebrea de Jerusalén, en Israel, desarrolló un marcador tipo PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para el locus de TG97; el marcador se utiliza en la selección asistida (MAS), en institutos de investigación y compañías privadas (Maxwell y col., 2006).

Agrama y Scott (2006) confirmaron que, al menos tres regiones sobre el cromosoma 6, contribuyen con la resistencia a begomovirus en las accesiones LA1932, LA1938 y LA2779 de *S. chilense*; cada región se asoció con un número de marcadores tipo RAPD (Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar). Se han hecho esfuerzos para buscar marcadores RAPD fuertemente asociados al loci de resistencia en líneas avanzadas derivadas de dichas accesiones (Ji y Scott., 2005a). Estos, a su vez, han sido convertidos en marcadores tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (Ji y Scott., 2005b).

Ji y col., (2007) mapearon otro locus de resistencia a begomovirus, *Ty-3*, entre los marcadores cLEG-31-P16 y T1079 sobre el brazo largo del cromosoma 6.

En el AVRDC (Asian Vegetable Research and Development Center) de Taiwán, Hanson y col., (2000), mediante marcadores RFLP, localizaron la introgresión de *S. habrochaites* en la línea H24, sobre el brazo largo del cromosoma 11, entre los marcadores TG393 y TG36. El gen de resistencia en H24, denominado *Ty-2*, se localizó cerca del marcador TG36 (Hanson y col., 2006).

La combinación de diferentes genes de resistencia, puede mejorar de manera significativa el desarrollo de cultivares de tomate con un nivel superior de resistencia al TYLCV (Lapidot y Polston, 2006).

2.6. Interacción genotipo x ambiente

La realización de ensayos varietales replicados en ambientes constituye la etapa final de los programas de mejoramiento genético para recomendar los cultivares mejores, que manifiesten estabilidad en la producción cuando son sembrados en diferentes condiciones ambientales. En el rendimiento del cultivo del tomate se ha comprobado una interacción genotipo x ambiente (GE, Genotype x Environment) altamente significativa, por ello la estabilidad de este carácter es un aspecto fundamental a considerar en la adopción de un nuevo cultivar. Generalmente se prefieren cultivares con rendimientos promedios consistentes, a aquellos con alto potencial pero inconsistentes a las variaciones ambientales (Gómez y col., 2000).

En la literatura hay una abundante información sobre el empleo de diferentes modelos estadísticos para estudiar e identificar las fuentes de la interacción GE tales como: el

análisis de varianza y la regresión sobre la media ambiental (Yates y Cochran, 1938; Finlay y Wilkinson, 1963; Eberhart y Russell, 1966).

Recientemente han sido utilizados modelos estadísticos que incorporan un gran número de variables del ambiente y/o de los cultivares para el estudio e interpretación de la interacción GE; estos son los modelos de Regresión factorial (FR, Factorial Regression) (Denis, 1988) y de Regresión con Mínimos Cuadrados Parciales (PLS, Partial Least Squares) (Aastveit y Martens, 1986).

Los modelos de los Efectos Principales Aditivos y de Interacción Multiplicativa (AMMI, Additive Main Effects and Multiplicative Interaction) emplean sólo las variables de respuesta fenotípica de mayor interés, sin embargo si la información sobre las variables del ambiente y los genotipos están disponibles, puede hacerse una regresión con los valores ambientales estimados por AMMI y superponerse en un gráfico biplot (Vargas y col., 1999).

El modelo AMMI combina las técnicas del Análisis de Varianza y Análisis de Componentes Principales (Gauch y Zobel, 1996); y proporciona mejor información para la modelación e interpretación de la interacción genotipo x ambiente, ya que ésta puede ser modelada en más de una dimensión, a través de una representación Biplot (Varela y Castillo, 2005).

Los biplots son modelos útiles para la evaluación visual de los genotipos en diferentes ambientes, han sido empleados para identificar subgrupos de ambientes y de variedades. Entre los descritos, Yan (1999) y Yan y col. (2000) propusieron un enfoque gráfico para analizar ensayos replicados en varios ambientes llamado GGE

biplot el cual se ha aplicado con buenos resultados para la representación visual de datos provenientes de dichos estudios (Yan, 2001).

3. ETAPAS DE TRABAJO

3.1. Esquema general del trabajo

Los antecedentes de este trabajo de tesis datan de 1992, cuando se inició en el IIHLD un programa de hibridación ínterespecífica del tomate con el progenitor silvestre *S. chilense* LA1969, hasta la obtención de seis poblaciones denominadas: 94-1, 94-2, 94-3, 94-4, 94-5 y 94-6. En las generaciones S0 a S3 de la población 94-6 fue donde el TYLCV mostró los valores más bajos de severidad e incidencia (datos no contemplados en este trabajo), en comparación con las otras cinco poblaciones de base, al ser seleccionadas en condiciones de infección natural.

El presente trabajo de tesis comenzó en 1998 con la selección individual en la generación S4 de la población 94-6, para la resistencia al TYLCV presente en Cuba (TYLCV-IL [CU]). Este aislado fue informado por primera vez por González y Valdés (1995) y ha sido comprobado que presenta un 98% de homología con el TYLCV de Israel; TYLCV-IL (Martínez y *col.*, 1998) ([Anexo 1](#)).

El esquema general del presente trabajo de tesis comprendió cuatro etapas, en correspondencia con los objetivos planteados. En la tabla 3 se muestra el esquema general de trabajo seguido.

Tabla 3. Esquema general del trabajo de tesis en función de los objetivos. Plan experimental y generaciones o ciclos que se estudiaron.

Objetivo	Plan experimental	Ciclo
1. Obtener líneas de tomate portadoras de una fuente de resistencia genética al TYLCV proveniente de <i>S. chilense</i> LA1969	1998- 2000 Programa de mejoramiento en condiciones de infección natural (desarrollo)	
	Selección para la resistencia al TYLCV- IL [CU] por severidad (escala 0-4 de Scott y Schuster, 1991), incidencia y concentración de ADN viral por individuo. Evaluación de caracteres agronómicos.	S4-S6
	Selección de caracteres agronómicos y concentración de ADN viral del TYLCV-IL [CU] por individuo. Evaluación de la severidad e incidencia.	S7-S8
	Comprobación de las diferencias entre las líneas obtenidas LD3, LD4, LD5 y LD6. Evaluación del rendimiento y sus componentes: número y masa promedio del fruto. Severidad e incidencia. Concentración de ADN viral en el 60% de las plantas de cada línea.	S9
2- Establecer una metodología de evaluación de la resistencia al TYLCV en las condiciones de Cuba.	Determinación del umbral de daño de la enfermedad mediante la relación entre la severidad y el rendimiento, en condiciones de infección natural del TYLCV-IL [CU].	S4-S8
	2001-2006 Investigaciones científico-metodológicas	
3. Caracterizar las nuevas fuentes de resistencia obtenidas, mediante marcadores moleculares asociados al gen <i>Ty-1</i> de <i>S. chilense</i> LA1969.	Comparación del daño producido por el TYLCV-IL[CU] sobre los caracteres vegetativos y agronómicos en condiciones de infección y no infección mediante vector. Determinación de los indicadores con mayor contribución al daño viral en condiciones de infección mediante vector. Determinación de los testigos diferenciales de resistencia en condiciones de infección mediante vector.	S9
	Genotipificación molecular de las líneas LD obtenidas.	
4. Recomendar variedades comerciales y líneas resistentes al TYLCV en Cuba.	Estabilidad del rendimiento en época de siembra óptima y primavera. Efectividad de la resistencia en ausencia de plaguicida químico para el control del TYLCV-IL [CU]. Evaluación de las líneas LD ante el TYLCV-Mld [RE], en la isla Reunión, ubicada en el océano Índico.	

3.2. Etapa 1. Obtención de líneas de tomate portadoras de una fuente de resistencia genética al TYLCV-IL [CU] proveniente de *S. chilense* LA1969

3.2.1. Materiales y métodos

Todos los experimentos de campo para obtener las líneas de tomate S9 se realizaron en áreas del IIHLD, perteneciente al Ministerio de la Agricultura (MINAGRI), situado en el kilómetro 33 ½ de la carretera Bejucal a Quivicán, municipio de Quivicán, provincia de La Habana, ubicado a los 22° 23' de latitud norte y 82° 23' de longitud oeste, a 11 m.s.n.m. En el Anexo 2 se muestran las variables climáticas que incidieron en el transcurso de los experimentos.

El manejo agronómico de las plantaciones se efectuó según el Instructivo Técnico vigente para este cultivo (CUBA, MINAGRI, 1984); durante el proceso de selección no se realizó la protección fitosanitaria contra los insectos.

Las semillas se sembraron en bandejas-semilleros de polivinilo con alvéolos de 32.5 cm³ sobre sustrato orgánico, humus de lombriz enriquecido con Litonita al 10% (Casanova y col., 2007). Las plántulas se mantuvieron 28 días en condiciones de aislador hasta el trasplante sobre suelo Ferralítico Rojo compactado según Hernández y col., (1999). El esquema de plantación, fue de 1,40 m entre surcos y 0,30 m entre plantas.

La selección se llevó a cabo por el método genealógico (*pedigree*). En las generaciones S4 a S6, la selección se realizó en las plantas con menor expresión de los síntomas de la enfermedad (0-2 grados de severidad) y menor concentración de ADN viral del TYLCV-IL [CU]. Las plantas seleccionadas en cada generación (tabla 4) fueron evaluadas para los caracteres agronómicos que se describen más adelante.

En las generaciones S7 y S8, la selección de los individuos se realizó empleando como criterios la mayor expresión de los caracteres agronómicos y la menor concentración de ADN viral. Se evaluaron adicionalmente los caracteres severidad e incidencia de la enfermedad.

En la generación S8 se extrajeron las semillas de la mejor planta seleccionada por cada línea LD3, LD4, LD5 y LD6 para la siembra de la generación S9. En ésta última, se realizó la comprobación de las diferencias entre las líneas obtenidas para el rendimiento y sus componentes, número de frutos por planta y masa promedio de los frutos. Para realizar la cuantificación del ADN viral, se muestreó al azar el 60% de las plantas de cada línea.

En la tabla 4 se muestran las generaciones o ciclos de selección, el número de individuos seleccionados en cada uno, las épocas de siembra y los años de ejecución del trabajo.

Tabla 4. Ciclos de selección, número de individuos, época de siembra y años de ejecución.

Ciclo	Número de plantas seleccionadas	Época de siembra*	Año
S4	75	P	1998
S5	90	O	1998
S6	36	P	1999
S7	83	O	1999
S8	100	P	2000
S9	-	O	2000

*Época de siembra: (P) Primavera, de 21 febrero-20 marzo; (O) Óptima, de 21 octubre-20 diciembre; (Gómez y col., 2000).

3.2.1.1. Caracteres evaluados

Los caracteres evaluados fueron:

1. Severidad: Valor promedio de síntomas de la enfermedad mostrado por cada individuo a los 45 días después del trasplante (ddt), según la escala propuesta por Scott y Schuster (1991), donde:

0= ausencia de síntomas de la enfermedad

1= síntomas ligeros de amarillamiento que se observan luego de un análisis cuidadoso

2= síntomas de amarillamiento en las hojas apicales que se observan con facilidad

3= síntomas de amarillamiento en las hojas apicales que curvan sus bordes hacia arriba, observados en una parte de la planta

4= síntomas de amarillamiento en las hojas apicales que curvan sus bordes hacia arriba, con aspecto similar al de una cuchara, se observa enanismo de las plantas.

2. Incidencia: Porcentaje de plantas infectadas sobre el total.

3. Cuantificación del ADN viral

El trabajo se realizó en el Departamento de Virología de Plantas del Centro Nacional de Salud Agropecuaria (CENSA) Las muestras fueron colectadas a los 45 ddt y se tomó, en todos los casos, la segunda hoja abierta de la región apical de la planta.

- Procesamiento del material vegetal

El ADN total de las muestras se extrajo según el procedimiento descrito por Dellaporta y *col.*, (1983). Adicionalmente, se extrajo el ADN de plantas de la variedad susceptible Campbell 28 infectadas con el TYLCV-IL [CU], previamente

verificado, el cual fue utilizado como control positivo en ensayos posteriores. El ADN total procedente de material vegetal en condiciones controladas de casa de cristal, fue utilizado como control negativo.

- Hibridación de ácidos nucleicos (HAN)

Se utilizó el método de hibridación de ácidos nucleicos no radioactiva (HAN-NR), con una sonda específica de la región intergénica del TYLCV-IL [CU], el cual fue secuenciado en su genoma completo (Martínez, 1998). El procedimiento de HAN-NR se realizó para detectar la presencia del virus en concentraciones muy bajas, de especial utilidad en casos de plantas asintomáticas; según el protocolo descrito por Quiñones y *col.*, (2004).

- Establecimiento del límite de detección

Se realizó una curva de concentración con un plásmido que contenía el inserto de la región intergénica del TYLCV-IL [CU] (PTY59). La concentración del plásmido fue estimada a partir de la lectura de densidad óptica (DO) a 260 nanómetros (nm) y ajustada a 1 000 ng/μl; posteriormente se realizaron diluciones seriadas de log 10 hasta obtener 0,01 ng/μl (Martínez, 1998).

Cada una de las diluciones obtenidas fue aplicada a una membrana de nitrocelulosa e hibridada. Se realizaron dos réplicas del experimento.

- Estimación de la concentración viral

La intensidad de la señal de hibridación se leyó y midió (tanto para la curva de calibración como para los materiales evaluados) mediante el programa “Kodak Digital Science ID”. Programas (Scientific Imaging System, Versión 1.0.2, 1994-1996). A partir de los datos de intensidad determinada y con la concentración

estimada del plásmido PTY59, se estableció la curva de calibración o de mejor ajuste, mediante un análisis de regresión (Microsoft Excel, 1997).

Para las muestras se estimó la concentración del ADN viral presente, interpolando los datos de intensidad de la señal con los datos de concentración obtenidos en la curva de calibración previamente realizada.

4. Caracteres agronómicos: adaptación al calor, rendimiento y sus componentes

Para describir el comportamiento fenotípico de las generaciones S4 a S9 se evaluaron los siguientes indicadores en las plantas seleccionadas:

- Indicadores de la adaptación al calor:
 - Número de flores promedio en los cuatro primeros racimos
 - Número de frutos promedio en los cuatro primeros racimos
 - Fructificación: porcentaje de frutos sobre flores en los cuatro primeros racimos (%)
- Rendimiento y sus componentes:
 - Número de racimos por planta
 - Número de frutos por planta
 - Masa promedio del fruto en gramos (g)
 - Rendimiento expresado en kilogramos por planta (Kg/pl), calculado como el número de frutos por planta por la masa promedio del fruto.

5. Caracteres vegetativos indicadores de los efectos del TYLCV-IL [CU]

En la generación S9 se evaluó, además, los caracteres vegetativos que expresan los efectos más pronunciados del TYLCV-IL sobre el detenimiento del crecimiento del

tomate: altura de la planta (cm) y diámetro de la copa (cm) (Cohen y Antignus, 1994).

3.2.1.2. Diseño experimental y procesamiento estadístico

El área experimental en cada generación de selección (S4 a S8) fue rodeada de un borde de plantas de la variedad Campbell 28 que se utilizó como testigo susceptible, lo que permitió monitorear la ausencia de escapes ante la infección natural en campo. A cada planta seleccionada se le cosecharon sus frutos y extrajeron las semillas; en la próxima generación se trasplantaron en un surco individual. El testigo susceptible Campbell 28 se sembró en surcos intercalados entre los surcos individuales de las plantas en selección. En la figura 3 se muestra una vista del área experimental en una de las generaciones de selección para la resistencia al TYLCV-IL [CU] en condiciones de infección natural.



Figura 3. Vista del área experimental en una de las generaciones de selección

Para describir el comportamiento fenotípico de los caracteres agronómicos evaluados en las plantas seleccionadas de las generaciones de selección S4 a S8, se estimaron los estadígrafos generales siguientes: media ($\bar{X}$), error estándar (ES) y coeficiente de variación (CV).

Para la determinación del efecto de la severidad de la enfermedad sobre los caracteres agronómicos en las generaciones S4 a S6, se estimaron los coeficientes de correlación lineal simple entre los valores individuales de las plantas seleccionadas para cada par de variables estudiadas.

Para el estudio del comportamiento agronómico en los ciclos S7 a S8, compuestas por plantas asintomáticas, se estimaron los coeficientes de correlación lineal simple entre los valores individuales de las plantas seleccionadas.

En la generación S9 se sembraron veinticinco plantas de cada genotipo distribuidas según un diseño de bloques al azar con tres repeticiones para comprobar las diferencias entre las líneas obtenidas LD3, LD4, LD5 y LD6, en relación con el rendimiento y sus componentes, número de frutos por planta y masa promedio del fruto.

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA de clasificación simple según modelo de efectos aleatorios para estimar la contribución relativa de los componentes de varianza, entre grupos o tratamientos (σ^2_t) y dentro de los grupos (σ^2_e) y el aporte de las diferencias entre las líneas (V_L) para cada uno de los caracteres estudiados (tabla 5).

Tabla 5. Estimación de los componentes de varianza en la generación S9.

Fuente de variación	gl	SC	CM	E (CM)
Entre grupos	(t-1)	SC _t	CM _t	$\sigma^2_e + r\sigma^2_t$
Dentro de grupos	t(N-1)	SC _e	CM _e	σ^2_e

Gálvez y Sigarroa (2006)

t: número de grupos o tratamientos; N: número de observaciones por grupo; r: número de bloques o réplicas

$\sigma^2_t = \text{CM}_t \cdot \text{CM}_e / r$ (varianza entre grupos o tratamientos)

$\sigma^2_e = \text{CMe}$ (varianza del error, que es directamente el valor del cuadrado medio del error)

$V_L = \sigma^2_t / (\sigma^2_t + \sigma^2_e)$

Los datos originales fueron previamente procesados para comprobar los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Se utilizó el programa Statgraphics plus, versión 5.1 para Windows.

3.2.2. Resultados y discusión

3.2.2.1. Caracterización fenotípica de las generaciones S4 a S8 en condiciones de infección natural del TYLCV-IL [CU]

3.2.2.1.1. Expresión de los síntomas del TYLCV-IL [CU] en las generaciones S4 a S8

- Severidad e incidencia del TYLCV-IL [CU] en las generaciones S4, S5 y S6.

Los resultados obtenidos en la primera etapa del trabajo de selección muestran que la severidad de los síntomas de la enfermedad disminuyó desde 1,2 en la generación S4 hasta 0,69 en S6; y el porcentaje de su incidencia desde 73% en S4 a 60,44% en S6. La variedad susceptible Campbell 28 (C28) mostró valores altos de severidad: S4 (3,33); S5 (3,20) y S6 (3,91) y una incidencia del 100% en todas las generaciones (figura 4).

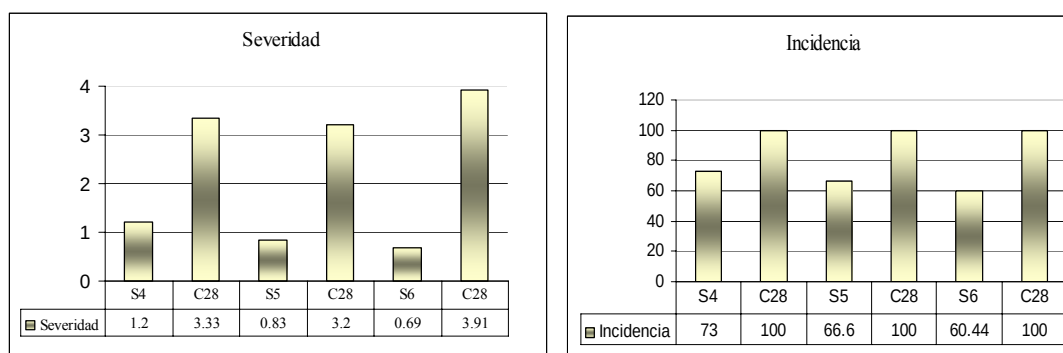


Figura 4. Severidad según escala (0-4) de Scott y Schuster (1991) y porcentaje de incidencia del TYLCV-IL [CU] en las generaciones S4 a S6 y en el testigo susceptible Campbell 28 (C 28).

La aplicación de medidas de control agrotécnicas, biológicas y químicas logran la reducción de las poblaciones de *B. tabaci* y así controlan los daños directos ocasionados en el tomate por las larvas y los adultos del insecto al alimentarse de la savia de las plantas. Sin embargo, el principal daño provocado por *B. tabaci* en este cultivo es como transmisora de begomovirus, lo que conlleva a efectos devastadores en las plantaciones cuando se utilizan cultivares susceptibles (Lapidot y Friedmann, 2002; Scott, 2006). Por lo que a nivel mundial se han realizado esfuerzos para lograr la introgresión de genes de resistencia presentes en especies silvestres del género *Solanum* al tomate cultivado (Pilowsky y Cohen, 1973; Laterrot y Moretti, 1994; Giordano y col., 2005).

En la figura 5 se muestra la variedad susceptible Campbell 28 con síntomas de enanismo, amarillamiento y las hojas en forma de cuchara provocados por el TYLCV-IL [CU].



Figura 5. Síntomas severos del TYLCV-IL [CU] en la variedad susceptible Campbell 28, en la época de siembra de primavera del año 1999

- Severidad e incidencia del TYLCV-IL [CU] en las generaciones S7 y S8

En las generaciones S7 y S8, las plantas no mostraron síntomas de la enfermedad; lo cual sugiere que la selección para la resistencia al TYLCV-IL [CU] en la generación S6 fue efectiva y se mantuvo el segmento introgresado de *S. chilense* LA1969. En Israel, Zakay y col., (1991) informaron a esta especie como la más resistente al TYLCV-IL en comparación con otras accesiones de *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites* y *S. peruvianum*, según el criterio de expresión de los síntomas y contenido del ADN viral.

La variedad susceptible Campbell 28 presentó una severidad de $3,87 \pm 0,33$ y $3,96 \pm 0,24$ respectivamente, con una incidencia del 100%.

En la figura 6 se muestra una línea asintomática y el testigo susceptible Campbell 28 en la generación de selección S7, la que coincidió con la época de siembra óptima del año 1999.



Figura 6. Severidad del TYLCV-IL [CU] en la generación S7. A la izquierda se muestra el testigo Campbell 28 y a la derecha una de las líneas seleccionadas.

Vidavsky y col., (2006) plantean que la selección de plantas para la resistencia al TYLCV-IL no sólo debe sustentarse en la ausencia de síntomas en campos infectados, incluso en condiciones de presión de inóculo alta, sino también en la determinación de la concentración del ADN viral. Además, es necesario acudir a la inoculación artificial mediante vector e injerto para comprobar la resistencia que se observa en condiciones de infección natural.

3.2.2.1.2. Comportamiento de los caracteres agronómicos en las generaciones S4 a S8

- Caracteres agronómicos en las generaciones S4, S5 y S6

Si se comparan los resultados de las generaciones S4 y S6 (tabla 6), ambas sembradas en época de primavera, se puede observar que las medias de los caracteres número de flores promedio en los cuatro primeros racimos, número de frutos por planta, masa promedio del fruto y rendimiento, disminuyeron en S6 en correspondencia con la selección efectuada para la resistencia al TYLCV-IL [CU]; ya que en dicha generación se registró la más alta infección viral, lo cual se pudo comprobar en el testigo susceptible Campbell 28 que mostró una severidad de 3,91 (figura 4).

Tabla 6. Estadígrafos generales de los caracteres agronómicos evaluados en las generaciones o ciclos S4 a S6

Ciclo	Estadígrafos generales	Flores promedio en los 4 primeros racimos	Frutos promedio en los 4 primeros racimos	Fructificación en los 4 primeros racimos (%)	Número de racimos por planta	Número de frutos por planta	Masa promedio del fruto (g)	Rendimiento (Kg/pl)
S4	X	2,31	1,27	55,00	5,25	9,60	102,54	0,98
	ES	± 0,05	± 0,02	± 0,67	± 0,08	± 0,47	± 1,03	± 0,04
	CV	21,99	17,09	10,75	14,37	42,46	8,77	39,55
S5	X	3,00	2,22	74,00	7,45	13,02	109,11	1,42
	ES	± 0,04	± 0,03	± 0,68	± 0,09	± 0,51	± 0,98	± 0,05
	CV	12,47	11,34	9,17	11,75	37,30	7,99	34,44
S6	X	1,94	1,48	76,00	7,66	8,94	97,66	0,88
	ES	± 0,07	± 0,07	± 1,08	± 0,16	± 0,49	± 3,60	± 0,07
	CV	21,86	27,30	8,68	13,22	33,05	23,58	52,35

No obstante lo anterior, el número de frutos promedio en los cuatro primeros racimos, el porcentaje de fructificación en los cuatro primeros racimos y el número de racimos por planta, aumentaron de S4 a S6, lo cual sugiere la adaptación de los individuos seleccionados para la resistencia al TYLCV-IL [CU] (tabla 6).

La introgresión de genes provenientes de especies silvestres en las plantas cultivadas es la vía más empleada para ampliar la base genética con fines mejoradores, en especial, para la resistencia a estreses bióticos y abióticos, a la vez que puede contribuir, aunque en menor grado, a mejorar el rendimiento en los genotipos cultivados. Zamir (2001) informó en el tomate que la gran variación presente en estas especies puede tener un efecto sobre la adaptación de las plantas al medio ambiente agrícola.

La adaptación climática es un proceso complejo que incluye productividad y calidad, se emplean diferentes indicadores para su estimación. En el tomate los más usados con este fin están asociados al proceso de floración y fructificación en los primeros racimos por ser extremadamente sensibles a las altas temperaturas, por lo que pueden utilizarse para identificar individuos con tolerancia al calor (Anaïs, 2001; Sato y col., 2006; Florido, 2007).

Es de destacar que los coeficientes de variación del rendimiento y sus componentes directos fueron importantes en S6, lo que indicó la variabilidad presente que permitió el desarrollo ulterior de la mejora por productividad. Gómez y col., (2000) informaron que cuando se ha creado una amplia variabilidad de base, es factible hacer avanzar la selección por productividad en el tomate a través del número y de la masa promedio del fruto.

- Caracteres agronómicos en las generaciones S7 y S8

En las generaciones S7 y S8 los valores promedios de los caracteres agronómicos aumentaron con relación a las generaciones S4 a S6; al no mostrar las plantas síntomas del TYLCV- IL [CU] (tablas 6 y 7).

Tabla 7. Estadígrafos generales de los caracteres agronómicos evaluados en los ciclos S7 y S8

Ciclo	Estadígrafos generales	Flores promedio en los 4 primeros racimos	Frutos promedio en los 4 primeros racimos	Fructificación en los 4 primeros racimos (%)	Número de racimos por planta	Número de frutos por planta	Masa promedio del fruto (g)	Rendimiento (Kg/pl)
S7	X	3,25	2,96	91,00	9,85	20,03	133,28	2,65
	ES	± 0,08	± 0,09	± 1,28	± 0,24	± 0,64	± 0,78	± 0,07
	CV	17,09	19,42	9,29	16,01	29,51	5,38	27,08
S8	X	3,94	3,74	95,00	12,27	23,92	144,85	3,45
	ES	± 0,03	± 0,03	± 0,46	± 0,14	± 0,48	± 1,43	± 0,04
	CV	6,92	8,64	5,09	12,03	20,31	9,90	14,38

Es de resaltar, que cuando se comparan las generaciones S5 y S7 (tablas 6 y 7), ambas en época óptima, se observa que el número de flores y frutos promedio en los cuatro primeros racimos, y el porcentaje de fructificación, aumentaron. Lo mismo ocurrió cuando se comparan las generaciones S6 y S8, en época de primavera; lo cual sugiere la adaptación de los individuos seleccionados.

En la figura 7 se observa el porcentaje de fructificación y la masa promedio del fruto mostrados, en uno de los cuatro primeros racimos, por la línea LD5 en la generación S8.



Figura 7. Porcentaje de fructificación y masa promedio del fruto mostrados, en uno de los cuatro primeros racimos, por la línea LD5.

Los caracteres número de frutos por planta y masa promedio del fruto, se tomaron como indicadores para la selección de genotipos con rendimientos promisorios. En la figura 8 se muestra una planta seleccionada para ambos caracteres de la línea LD3 en época de primavera. Álvarez (1987) recomendó el empleo de los mismos para la selección indirecta del rendimiento, los cuales alcanzan valores de intermedios a altos de heredabilidad.



Figura 8. Planta de la línea LD3 seleccionada en la época de primavera

La variabilidad disminuyó en la mayoría de los caracteres agronómicos estudiados, lo cual se evidenció a través de los coeficientes de variación exhibidos. La paulatina disminución de sus valores indica la tendencia a alcanzar el estado de homocigosis en dichos caracteres. Conforme se avanza en el proceso de selección, la población resultante va mostrando el carácter con mayor intensidad cada vez, hasta que finalmente se alcanza un estado en el que no puede producirse un incremento en la intensidad del carácter; el cual se corresponde teóricamente con la obtención de una población homocigótica para los genes que intervienen en su determinación.

Los cultivares resistentes al TYLCV-IL [CU] deben cubrir las necesidades productivas de cada lugar. En este sentido, el rendimiento alcanzado en la generación S8 se considera alto (3,45 Kg/pl), así como la masa promedio del fruto (144,85 g), lo que se corresponde con lo esperado en Cuba para el tomate producido a campo abierto (Cardoza, 2007).

Friedmann y *col.*, (1998) coinciden en que el desarrollo de cultivares resistentes es la mejor opción para el control del TYLCV; la línea obtenida por dichos autores

denominada TY172, proveniente de *S. peruvianum*, asintomática en condiciones de campo e infección artificial, mostró un valor promedio de masa del fruto de 71 g; 63,1 frutos por planta y un rendimiento de 4,4 Kg/pl en las condiciones de Israel.

3.2.2.2. Estimación de los coeficientes de correlación lineal simple entre los valores individuales de las plantas seleccionadas en las generaciones S4 a S8

- Relación entre la severidad del TYLCV-IL [CU] y los caracteres agronómicos en las generaciones S4, S5 y S6.

En la tabla 8 se muestran las correlaciones fenotípicas que resultaron significativas ($P \leq 0,05$) entre la severidad del TYLCV-IL [CU] y los caracteres agronómicos evaluados en los ciclos o generaciones S4 a S6. Se destaca que la severidad del TYLCV-IL [CU] correlacionó de forma negativa, alta y significativa, con los caracteres número de frutos por planta y rendimiento en las generaciones estudiadas. Consecuentemente, estos dos caracteres podrían ser indicadores que expresen mejor el daño provocado por el TYLCV-IL en nuestras condiciones. Lapidot y col., (1997) afirmaron que el efecto de la infección sobre los componentes del rendimiento, es un elemento fundamental para la evaluación de la resistencia al TYLCV-IL.

Tabla 8. Correlaciones fenotípicas entre la severidad del TYLCV-IL [CU] y los caracteres agronómicos evaluados en los ciclos S4 a S6.

Caracteres agronómicos Ciclo		Flores promedio en los 4 primeros racimos	Frutos promedio en los 4 primeros racimos	Fructificación en los 4 primeros racimos (%)	Número de racimos por planta	Número de frutos por planta	Masa promedio del fruto (g)	Rendimiento (Kg/pl)
Severidad	S4	-0,3241*	-0,2619*	-0,4159*	-0,4287	-0,7788*	-0,1091	-0,7685*
	S5	-0,4842	-0,3863	-0,3102	-0,3020	-0,8308*	-0,1041	-0,8249*
	S6	-0,7025*	-0,6704*	-0,5352	-0,4532	-0,8029*	-0,5880*	-0,8115*

* Significativo para $P \leq 0,05$

En la generación S6, además, la severidad del TYLCV-IL [CU] incidió significativamente sobre el número de flores y frutos promedio en los cuatro primeros racimos y la masa promedio del fruto; lo cual se evidencia en las correlaciones negativas y significativas, con los caracteres agronómicos mencionados.

- Relación entre los caracteres agronómicos en las generaciones S7 y S8

En las generaciones S7 y S8 hubo una correlación positiva, alta y significativa, entre el número de flores y de frutos promedio en los cuatro primeros racimos (0,8863* y 0,8579*, respectivamente) (tabla 9).

Tabla 9. Correlaciones fenotípicas entre los caracteres agronómicos evaluados en los ciclos S7 y S8.

Caracteres agronómicos		Flores promedio 4 primeros racimos	Frutos promedio 4 primeros racimos	Fructificación 4 primeros racimos (%)	Número racimos por planta	Número frutos por planta	Masa promedio fruto (g)
Ciclo							
Frutos promedio 4 primeros racimos	S7	0,8863*					
	S8	0,8579*					
Fructificación 4 primeros racimos (%)	S7	0,1903	0,2874				
	S8	0,1048	0,0832				
Número de racimos por planta	S7	0,4243*	0,3440*	0,0420			
	S8	0,3020*	0,1760	0,0292			
Número de frutos por planta	S7	0,0327	0,0690	0,1280	0,2921		
	S8	0,0656	0,0663	0,0945	0,4570*		
Masa promedio del fruto (g)	S7	0,2002	0,2813	-0,3230*	-0,2953	-0,5829*	
	S8	-0,1184	-0,0834	-0,3557*	0,1563	-0,4501*	
Rendimiento (Kg/pl)	S7	0,1317	0,2038	0,0081	0,2396	0,9539*	0,3217
	S8	0,0379	0,0564	0,0665	0,4452*	0,9110*	0,2494

* Significativos para $\alpha \leq 0,05$.

En las dos generaciones, sobresale la dependencia del rendimiento con su componente el número de frutos por planta, los que correlacionaron de forma positiva, alta y significativa (0,9539* y 0,9110*, respectivamente). Se muestra,

además, la correlación negativa y significativa entre el número de frutos por planta y la masa promedio del fruto (-0.5829* y -0.4501*, respectivamente).

Moya y *col.*, (1991) y Álvarez y *col.*, (2003) informaron mayor asociación entre el número de frutos por planta con el rendimiento, por lo que el avance por adaptación se ha apoyado más en este carácter que en la masa del fruto, pero el mejor compromiso se establece a nivel de valores medios de ambos componentes (Gómez y *col.*, 2000).

3.2.2.3. Determinación de líneas diferentes para los caracteres productivos en la generación S9

En la tabla 10, se muestra que el valor de la varianza producido por la diferencia entre los grupos es mayor que el valor de la varianza producido por cada grupo para los caracteres número de frutos por planta, masa promedio del fruto y rendimiento en la generación S9; lo que permitió caracterizar cuatro grupos o líneas: LD3, LD4, LD5 y LD6.

Tabla 10. Estimación de los componentes de varianza y su contribución en S9.

Fuentes de variación	Número de frutos por planta	Masa promedio del fruto (g)	Rendimiento (Kg/pl)
Varianza entre los grupos o tratamientos (σ^2_t)	289,75	3901,12	0,37
Varianza dentro de los grupos (σ^2_e)	1,41	4,14	0,03
Contribución de las diferencias entre líneas (V_L)	0,98	0,99	0,92
	P≤0,05	P≤0,05	P≤0,05

La contribución de las diferencias entre las líneas fue alta en los caracteres número de frutos por planta, masa promedio del fruto y rendimiento (tabla 10). Ahmed (2000) y

Depestre y col., (2004) informaron resultados de este tipo en el avance de la selección en el pimiento (*Capsicum annuum*) para la creación de cultivares.

3.2.2.4. Análisis del comportamiento de la enfermedad en las generaciones S4 a S8

En la tabla 11 se muestra de forma resumida, el comportamiento promedio de las plantas en las generaciones S4 a S8, y el testigo susceptible Campbell 28.

Tabla 11. Resumen del comportamiento promedio de las plantas en las generaciones de selección S4 a S8 y el testigo susceptible Campbell 28

Indicador	Generación					Testigo susceptible
	S4	S5	S6	S7	S8	
Severidad *	1,2	0,83	0,69	0	0	Campbell 28
	3,33	3,20	3,91	3,87	3,96	
Incidencia	73,00	66,60	60,44	0	0	Campbell 28
	100	100	100	100	100	
Rangos de concentración de ADN viral (ng/μl)** Porcentaje de plantas en cada generación						Campbell 28
	S4	S5	S6	S7	S8	
≥1 000	0	0	0	0	0	100
> 100 ≤1 000	0	0	0	0	0	0
> 10 ≤100	100	66	64	34	30	0
0,1-1 ≤10	0	34	36	66	70	0
Rendimiento(Kg/pl)	0,98	1,42	0,88	2,65	3,45	0,16

* Escala (0-4) de Scott y Schuster (1991) ** nanogramos/microlitro Quiñones (2002)

En la generación S4 las plantas seleccionadas para la resistencia al TYLCV- IL [CU] presentaron una severidad promedio de 1,2 y un contenido de ADN viral $>10 \leq 100$ ng/μl (tabla 11).

En las generaciones S5 y S6, la severidad fue de 0,83 y 0,69 respectivamente; en ellas se detectó un 34% y 36% de plantas, respectivamente, con un contenido de ADN viral más bajo, en el rango $0,1-1 \leq 10$ ng/μl; a partir de las cuales se continuó la selección. En las generaciones S7 y S8, las plantas no mostraron síntomas de la

enfermedad y aumentó el porcentaje de plantas 66% y 70%, respectivamente, en dicho rango (tabla 11).

Los resultados sugieren que la severidad por si sola no constituye un indicador de resistencia al virus, por lo que es necesario, además, determinar la concentración de ADN viral.

Lo anterior indica la importancia y efectividad de la introgresión de *S. chilense* LA1969, la cual posee el gen *Ty-1*. A medida que avanzó la selección, la concentración de ADN viral disminuyó, a pesar de las condiciones de alta infección en el campo, lo que se comprobó mediante los valores de severidad en la variedad susceptible Campbell 28 y su concentración de ADN viral, mayor o igual que 1 000 ng/ μ l (tabla 11).

El empleo de cultivares con menor acumulación de virus, contribuye además a disminuir el fondo infeccioso en los campos (Zamir y *col.*, 1994; Moriones y Navas-Castillo, 2008).

De acuerdo con los resultados obtenidos por Quiñones y *col.*, (2004), el método de hibridación de ácidos nucleicos no radioactivo se emplea para la detección de los begomovirus en Cuba y se considera que éste puede ser utilizado con alta confiabilidad para la detección del TYLCV-IL [CU] en la evaluación de materiales resistentes a dicho patógeno, en un programa de selección mejoradora. Salus y Maxwell (2006) informan la aplicación de técnicas moleculares al programa de mejoramiento genético para la resistencia a begomovirus en Guatemala.

3.3. Etapa 2. Metodología de evaluación de la resistencia al TYLCV [CU], en las condiciones de Cuba

3.3.1. Materiales y métodos

Para la determinación de una metodología de evaluación de la resistencia al TYLCV[CU] en las condiciones de Cuba se procedió a:

- a. Determinación del umbral de daño de la enfermedad mediante la relación entre la severidad y el rendimiento. Se tomaron en consideración las medias generales de dichos caracteres en las generaciones S4 a S8, en condiciones de infección natural del TYLCV-IL [CU], a partir de la información mostrada en la tabla 11.
- b. Comparación del daño producido por el TYLCV-IL[CU] sobre los caracteres vegetativos y agronómicos, en condiciones de infección y no infección mediante vector.
- c. Determinación de los indicadores con mayor contribución al daño viral, en condiciones de infección mediante vector.
- d. Determinación de los testigos diferenciales de resistencia, en condiciones de infección mediante vector.

Además, para comprobar la resistencia de las líneas obtenidas a la multiplicación viral se realizó la infección mediante injertos.

3.3.1.1. Material vegetal

En el material vegetal utilizado en los incisos b, c, d y en la infección mediante injerto, se incluyeron genotipos con comportamiento diferencial (tabla 12)

Tabla 12. Material vegetal utilizado y su procedencia

Genotipo	Procedencia
LD3	Líneas asintomáticas de la generación S9 (IIHLD, Cuba)
LD4	
LD5	
LD6	
HA 3108	Híbrido F ₁ comercial altamente tolerante al TYLCV-IL (Hazera Genetics, Brurim, Israel).
ARO 8479	Híbrido F ₁ comercial tolerante al TYLCV-IL (Hazera Genetics, Brurim, Israel).
Campbell 28 (C28)	Cultivar comercial susceptible al TYLCV-IL (EE.UU.) (Moore, 1971)

3.3.1.2. Material viral

El inóculo viral procedió del TYLCV-IL [CU]. Como fuente primaria de inóculo se utilizaron plantas infectadas del cultivar susceptible Campbell 28, ello fue confirmado mediante el método de HAN-NR realizado en el CENSA. El inóculo se mantuvo en plantas de esta variedad en condiciones controladas.

3.3.1.3. Método de inoculación mediante injerto

Para la comprobación de la resistencia a la multiplicación viral, diez plantas por genotipo se trasplantaron en macetas a los 20 días después de ser mantenidas en condiciones de aislador. Tres semanas después del trasplante se inocularon mediante injertos con yemas de plantas infectadas de Campbell 28, las que mostraban síntomas severos de la enfermedad (grado 4), según la escala de 0-4 propuesta por Scott y Schuster (1991). Las plantas se mantuvieron en condiciones de aislador con tela anti-*Bemisia* para evaluar la severidad e incidencia de la enfermedad a los 20, 45 y 60 días después de la infección (ddi).

3.3.1.4. Método de inoculación mediante vector

Para realizar la infección mediante vector y comprobar la resistencia a la transmisión viral, se emplearon adultos de *Bemisia tabaci*, que se obtuvieron a partir de ninfas, las cuales fueron transferidas a plantas de tomate del cultivar susceptible Campbell 28, infectadas con el TYLCV-IL [CU].

Las plantas se mantuvieron en condiciones de aislador con tela anti *Bemisia*, a una temperatura promedio de 28/24°C (día/noche) y 80 +/- 10% de humedad relativa. Los insectos se alimentaron de estas plantas hasta que se utilizaron en el ensayo de transmisión viral.

3.3.1.5. Ensayo de transmisión viral

Un total de 20 plantas de cada genotipo se infectaron con moscas blancas virulíferas al estado de emisión del segundo par de hojas verdaderas, el periodo de acceso a la inoculación fue de 48 horas, las plantas se asperjaron con Imidacloprid (Confidor®, Bayer) para eliminar los insectos y garantizar que la inoculación fuera sólo durante 48 horas. Se utilizaron 50 insectos por planta (Lapidot y col., 1997). Un número similar de plantas de cada genotipo, no infectadas por el TYLCV-IL [CU], se usaron como controles. Estas se mantuvieron en condiciones de aislador hasta el trasplante y se asperjaron con Imidacloprid (Confidor®, Bayer) antes de dicha labor. Todas las plantas se sembraron en bandejas-semilleros de polivinilo.

3.3.1.6. Caracteres evaluados

Los caracteres evaluados fueron los antes descritos: severidad, incidencia y cuantificación del ADN viral del TYLCV-IL [CU] dentro del rango esperado para

diferenciar el material resistente, desde 0,01 ng/μl hasta un valor $\geq 1\ 000$ ng/μl, a los 55 días después de la infección por vector; caracteres vegetativos y agronómicos.

3.3.1.7. Ensayo de campo y diseño experimental

El trabajo se desarrolló en el IIHLD en el mes de febrero de los años 2001 y 2002.

Las plantas inoculadas y no inoculadas de cada genotipo se trasplantaron al campo sobre suelo Ferralítico Rojo compactado (Hernández y col., 1999) a los 28 días después de ser mantenidas en condiciones de aislador.

Cinco plantas infectadas y cinco no infectadas de cada genotipo se distribuyeron en surcos apareados; cada par de surcos se repitió cuatro veces y se realizó una distribución al azar según Lapidot y col., (1997). El experimento fue rodeado por un borde protector compuesto por plantas de las líneas LD3, LD4, LD5 y LD6.

Se aplicó Confidor® en la cuarta semana luego del trasplante y *Verticillium lecanii* sistemáticamente, para el control de la ninfas del insecto.

3.3.1.8. Procesamiento estadístico

Para cada carácter estudiado, las medias de los tratamientos infectado y no infectado de cada genotipo se compararon mediante la prueba de t-test para $P \leq 0,05$.

Para la determinación de los indicadores con mayor contribución al daño viral en condiciones de infección mediante vector, se consideraron los caracteres severidad, número de frutos por planta, masa promedio de los frutos y rendimiento, mediante un análisis de Componentes Principales (Morrison, 1967).

Para la determinación de los testigos diferenciales de resistencia en condiciones de infección mediante vector, se consideraron los caracteres severidad del TYLCV-IL

[CU] a los 55 ddi por vector; número de frutos por planta, rendimiento y altura de la planta (porcentaje de reducción respecto al tratamiento no infectado) y concentración de ADN viral en el tratamiento infectado.

Se utilizó el programa Statgraphics plus, versión 5.1 para Windows.

3.3.2. Resultados y discusión

3.3.2.1. Determinación del umbral de daño de la enfermedad mediante la relación entre la severidad y el rendimiento en las generaciones S4 a S8, en condiciones de infección natural del TYLCV-IL [CU]

La relación entre la severidad y el rendimiento del tomate en las generaciones S4 a S8 sirvió para establecer el umbral de daño de la enfermedad en el presente trabajo. En el mismo, para lograr 2,65 kilogramos por planta fue preciso que las plantas se mostraran asintomáticas en condiciones de alta infección natural del TYLCV-IL [CU] (tabla 13).

Tabla 13. Relación entre la severidad y el rendimiento del tomate en las generaciones S4 a S8.

Generación	Severidad*	Rendimiento (Kg/pl)
S4	1,2	0,98
S5	0,83	1,42
S6	0,69	0,88
S7	0	2,65
S8	0	3,45

*Escala (0-4) Scott y Schuster (1991)

La perspectiva de desarrollo del tomate en Cuba (Cardoza y *col.*, 2000) contempla la obtención de rendimientos de 50 t/ha, para alcanzar este objetivo se hace necesario el uso de variedades resistentes al TYLCV-IL [CU]. Al irrumpir esta enfermedad en el país y registrarse pérdidas de hasta el 100% en variedades susceptibles, como las que tradicionalmente venían empleándose en Cuba, fue preciso la importación de semillas

de híbridos F₁ israelíes, con tolerancia al TYLCV-IL, para sembrar una parte de la superficie dedicada al cultivo a campo abierto (alrededor de 1 300 hectáreas anualmente), así como la importación de plaguicidas químicos comerciales a base de Imidacloprid (Gaucho y Confidor) para el tratamiento fitosanitario. Estas medidas de control resultan muy costosas, puesto que el precio de las semillas importadas es de alrededor de 1 000 USD/Kg. De ello se desprende el aporte del programa de mejoramiento genético para la resistencia al TYLCV-IL [CU].

3.3.2.2. Comparación del daño producido por el TYLCV-IL [CU] sobre los caracteres vegetativos y agronómicos, en condiciones de infección y no infección mediante vector

3.3.2.2.1. Comparación del daño producido por el TYLCV-IL [CU] sobre los caracteres vegetativos

Los resultados de la comparación del daño producido por el TYLCV-IL [CU] sobre los caracteres vegetativos, fueron similares en los dos experimentos realizados en años consecutivos. En la tabla 14 se muestran los resultados de la comparación para cada uno de los genotipos estudiados en el experimento del año 2001.

A pesar de que uno de los efectos más pronunciados del TYLCV-IL sobre las plantas de tomate es la detención del crecimiento vegetal, en las líneas LD3, LD4, LD5 y LD6 y el testigo altamente tolerante HA 3108, no se observaron afectaciones en sus características vegetativas debido al tratamiento infectado mediante vector; en tanto que el testigo tolerante ARO 8479 y el testigo susceptible, Campbell 28, presentaron una disminución significativa en los caracteres altura y diámetro de la copa (tabla 14).

Tabla 14. Efecto del TYLCV-IL [CU] sobre los caracteres vegetativos, en condiciones de infección y no infección mediante vector.

Genotipo	Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro de la copa (cm)
LD 3	Infectado	48,0 a	52,0 a
	No infectado	47,0 a	54,0 a
LD 4	Infectado	60,2 a	45,0 a
	No infectado	58,8 a	45,6 a
LD 5	Infectado	39,8 a	41,5 a
	No infectado	40,6 a	44,0 a
LD 6	Infectado	85,8 a	69,2 a
	No infectado	83,1 a	70,1 a
HA 3108	Infectado	119,6 a	94,3 a
	No infectado	122,1 a	96,4 a
ARO 8479	Infectado	45,0 a	40,0 a
	No infectado	59,0 b	52,0 b
Campbell 28	Infectado	30,0 a	28,0 a
	No infectado	41,0 b	40,0 b

a, b: medias con letras diferentes difieren entre sí según prueba t-test $P \leq 0,05$

La conveniencia de emplear indicadores de la afectación vegetativa ante el TYLCV-IL ha sido informada por otros autores. Lapidot y col., (1997) en un estudio comparativo del nivel de resistencia al TYLCV-IL, en parcelas inoculadas y no inoculadas, observaron que la línea TY172, obtenida en Israel, no mostró afectación en el indicador vegetativo peso fresco de la planta, el cual está relacionado con su altura y diámetro de la copa.

3.3.2.2.2. Comparación del daño producido por el TYLCV-IL [CU] sobre los caracteres agronómicos

Los resultados de la comparación del daño producido por el TYLCV-IL [CU] sobre los caracteres agronómicos, fueron similares en los dos experimentos realizados en años consecutivos. En la tabla 15 se muestran los resultados de la comparación para cada uno de los genotipos estudiados en el experimento del año 2001.

Tabla 15. Efecto del TYLCV-IL[CU] sobre los caracteres agronómicos, en condiciones de infección y no infección mediante vector.

Genotipo	Tratamiento	Flores promedio en los 4 primeros racimos	Frutos promedio en los 4 primeros racimos	Fructificación en los 4 primeros racimos (%)	Número racimos por planta	Número frutos por planta	Masa promedio del fruto (g)	Rendimiento (Kg/pl)
LD 3	Infectado	14,0 a	11,0 a	79,0 a	11,0 a	30,0 a	48,0 a	1,44 a
	No infectado	13,0 a	10,0 a	77,0 a	13,0 a	29,0 a	46,0 a	1,33 a
LD 4	Infectado	12,0 a	9,0 a	75,0 a	12,0 a	30,0 a	61,0 a	1,83 a
	No infectado	9,0 a	7,0 a	78,0 a	13,0 a	27,0 a	57,0 a	1,54 a
LD 5	Infectado	10,0 a	9,0 a	90,0 a	11,0 a	31,0 a	64,0 a	1,98 a
	No infectado	10,0 a	9,0 a	90,0 a	12,0 a	30,0 a	63,0 a	1,89 a
LD 6	Infectado	12,0 a	11,0 a	92,0 a	12,0 a	32,0 a	66,0 a	2,11 a
	No infectado	13,0 a	12,0 a	92,0 a	11,0 a	31,0 a	67,0 a	2,07 a
HA 3108	Infectado	10,0 a	8,0 a	80,0 a	15,0 a	32,0 a	82,0 a	2,62 a
	No infectado	11,0 a	9,0 a	82,0 a	16,0 a	33,0 a	83,0 a	2,74 a
ARO8479	Infectado	10,0 a	7,0 a	70,0 a	13,0 a	21,0 a	91,76 a	1,93 a
	No infectado	9,0 a	6,0 a	67,0 a	15,0 a	23,0 a	91,0 a	2,09 a
C 28	Infectado	5,0 a	2,0 a	40,0 a	5,0 a	3,00 a	67,0 a	0,20 a
	No infectado	10,0 b	8,0 b	80,0 b	9,0 b	15,0 b	65,0 b	0,98 b

a, b: medias con letras diferentes difieren entre sí según prueba t-test $P \leq 0,05$

En las líneas LD3, LD4, LD5 y LD6 y el testigo altamente tolerante HA 3108, no se observaron diferencias significativas en los caracteres agronómicos evaluados entre las parcelas infectadas y no infectadas. El testigo tolerante ARO 8479, a pesar de haber presentado una disminución significativa en los caracteres altura y diámetro de la copa, no experimentó una diferencia significativa en la reducción de sus caracteres agronómicos. Las líneas LD5 y LD6 mostraron mayor fructificación, lo que indica su mejor adaptación climática (tabla 15).

El testigo susceptible Campbell 28 (C28) presentó diferencias significativas para los caracteres: número de flores y frutos promedio en los cuatro primeros racimos, porcentaje de fructificación, número de racimos por planta, número de frutos por planta y rendimiento (tabla 15).

El carácter masa promedio del fruto, en el testigo susceptible Campbell 28, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos; lo cual sugiere que éste no incidió en la reducción del rendimiento total por efecto del TYLCV-IL [CU], en tales condiciones (tabla 15).

En las líneas e híbridos estudiados, se inhibió el efecto del TYLCV-IL [CU] sobre el rendimiento total. En estos genotipos no se afectaron los caracteres número de frutos por planta, masa promedio del fruto ni rendimiento. Lo anterior confirma que el uso de cultivares resistentes parece la mejor vía para reducir los daños provocados por el TYLCV-IL (Lapidot y Polston, 2006).

En la figura 9 se muestra una planta de la línea LD6, después del trasplante, la cual fue sometida a inoculación viral mediante vector en un estadio inicial de su desarrollo.



Figura 9. Planta de línea LD6, asintomática, después de la infección del TYLCV-IL [CU] mediante vector.

Lapidot y *col.*, (1997) en un experimento de este tipo, informaron que la línea TY172 mostró un alto nivel de resistencia al TYLCV-IL, las plantas infectadas no mostraron síntomas de la enfermedad y sufrieron sólo el 20% de pérdidas en el rendimiento en comparación con las plantas no inoculadas. La masa del fruto no se afectó por la incidencia viral, pero hubo una reducción en el número de frutos por planta.

3.3.2.3. Determinación de los indicadores con mayor contribución al daño viral, en condiciones de infección mediante vector

El Análisis de Componentes Principales realizado permitió constatar que las dos primeras componentes, CI y CII, extrajeron el 99,21% de la variabilidad total. La primera componente extrajo el 65,77% de esta variabilidad. Las variables que mejor explicaron la varianza en la primera componente fueron el número de frutos por planta y la severidad, con signos contrarios; indicadores con mayor expresión externa del daño viral. La segunda componente extrajo una varianza de 33,44%, la que fue explicada por la masa promedio del fruto, pero no estuvo correlacionada con la severidad (tabla 16).

Tabla 16. Correlaciones entre las variables estudiadas y las dos primeras componentes

Variable	Componente I	Componente II
Número de frutos por planta	0,6070	- 0,1040
Masa promedio del fruto	0,0123	0,8640
Rendimiento	0,5455	0,4002
Severidad	- 0,5776	0,2871
Autovalores	2,6310	1,3377
% de varianza	65,77	33,44

3.3.2.4. Determinación de los testigos diferenciales de resistencia, en condiciones de infección mediante vector

3.3.2.4.1. Severidad, incidencia y concentración del ADN del TYLCV-IL [CU]

Las líneas LD3, LD4, LD5 y LD6, obtenidas en el presente trabajo, y el testigo altamente tolerante HA 3108 no mostraron síntomas de la enfermedad durante todo el período del ensayo; en tanto que el testigo tolerante ARO 8479 desarrolló una severidad de 2,2 y una incidencia del 100% y el testigo susceptible Campbell 28, una severidad de 3,5 en el 100% de las plantas, a los 55 ddi mediante vector.

Las líneas LD3, LD4, LD5 y LD6 mostraron valores muy bajos de ADN viral (0,01–1 ng/μl). Lapidot y col., (1997) informaron en la línea TY172, portadora de resistencia proveniente de *S. peruvianum*, una concentración de ADN del TYLCV-IL de 0,25 ng/μl.

En los testigos HA 3108, altamente tolerante; ARO 8479, tolerante, y Campbell 28, susceptible, la acumulación de ADN viral fue alta $\geq 1\ 000$ ng/ μl. Los resultados obtenidos muestran que los valores de severidad y concentración de ADN viral no guardan una relación lineal.

En las líneas LD3, LD4, LD5 y LD6, la resistencia fue eficiente aún en condiciones de alto nivel de inóculo. Fuentes (2008), luego de la evaluación de la resistencia al TYLCV-IL[CU] de la línea LD5 (Vyta), en comparación con plantas derivadas de un clon transgénico de tomate, corroboró los resultados aquí obtenidos.

Los valores de concentración de ADN viral fueron muy bajos en las líneas LD asintomáticas, no así en los testigos empleados, los cuales mostraron los valores máximos de concentración viral en el experimento.

Los resultados permiten ratificar la necesidad de considerar los indicadores de severidad y concentración del ADN viral como criterios para la evaluación de la resistencia al TYLCV-IL [CU], puesto que un cultivar como HA 3108, asintomático,

puede mostrar una elevada concentración de ADN viral constituyendo un peligroso reservorio en el campo.

Lapidot y *col.*, (1997) plantean que la ausencia de síntomas y la reducción de la acumulación viral no son los únicos indicadores para determinar el nivel de resistencia al TYLCV-IL de un genotipo dado; ello debe complementarse con la evaluación productiva del mismo.

3.3.2.4.2. Comportamiento diferencial de las líneas obtenidas y los testigos en relación a la infección del TYLCV-IL [CU]

Las líneas LD3, LD4, LD5 y LD6 no presentaron síntomas de la enfermedad a los 55 ddi mediante vector, ni reducción en el número de frutos por planta y el rendimiento; sólo en LD5 la altura de la planta disminuyó levemente (1,97%). La concentración viral fue muy baja, en el rango 0,01 – 1 ng/μl (tabla 17).

Tabla 17. Comportamiento diferencial de los genotipos evaluados en relación a la infección del TYLCV-IL [CU] mediante vector y clasificación otorgada.

Genotipo	Severidad* (55 ddi)	Altura (cm)	Número de frutos por planta	Rendimiento (kg/pl)	Concentración de ADN viral (ng/μl)**	Clasificación
		% reducción respecto al tratamiento no infectado				
LD3	0	0	0	0	0,01 – 1	Resistente
LD4	0	0	0	0	0,1 – 1	Resistente
LD5	0	1,97	0	0	0,1 – 1	Resistente
LD6	0	0	0	0	0,1 – 1	Resistente
HA 3108	0	2,04	3,03	4,37	≥ 1 000	Altamente tolerante
ARO 8479	2,2	23,72	8,69	7,65	≥ 1 000	Tolerante
Campbell 28	3,5	28,82	80	79,59	≥ 1 000	Susceptible

* Escala (0-4) Scott y Schuster (1991) ddi: días después de la inoculación ** : nanogramos /microlitro Quiñones y *col.*, (2004)

Las líneas se clasificaron como resistentes en consecuencia con lo planteado por Lapidot y col., (1997); éstas pueden suprimir el desarrollo de los síntomas de la enfermedad (grado 0 de la escala de Scott y Shuster, 1991) y reducir la multiplicación viral ($\leq 1\text{ng}/\mu\text{l}$) sin afectación del rendimiento.

Por otra parte, Lapidot y col., (2001) informaron un efecto de la resistencia al TYLCV-IL de la planta huésped en la adquisición y transmisión del mismo por su vector *B. tabaci*. Los resultados demostraron que, en esencia, mientras mayor es el nivel de resistencia expresada, menor utilidad tiene la planta como fuente viral. Consecuentemente, luego de la adquisición del TYLCV-IL a partir de una planta resistente, el vector será menos eficiente en su transmisión.

El testigo altamente tolerante HA 3108 no presentó síntomas de la enfermedad a los 55 ddi, la altura de la planta se redujo 2,04%, el número de frutos por planta 3,03% y el rendimiento 4,37%, respecto al tratamiento no infectado; la concentración de ADN viral fue de 100% con relación al testigo susceptible Campbell 28, por ello se clasificó como altamente tolerante (tabla 17).

Cooper y Jones, (1983) refieren la tolerancia cuando, en respuesta a la infección viral, el hospedero expresa síntomas ligeros o muy ligeros de la enfermedad, pero el virus se multiplica en la planta aunque esta puede producir buenos rendimientos. En el caso de estos dos híbridos, los resultados coinciden con la clasificación que les otorga su patrocinador (Hazera, 2004).

Por su parte, la variedad Campbell 28 mostró una severidad de 3,5 a los 55 ddi, la altura de la planta se redujo 28,82%, el número de frutos por planta 80%, así como el

rendimiento, respecto al tratamiento no infectado; la concentración de ADN viral fue de 100%, por ello se clasificó como susceptible (tabla 17).

La utilidad de establecer el comportamiento diferencial de los genotipos ante el TYLCV-IL fue planteada por Lapidot y *col.*, (2006) al reconocer que uno de los mayores obstáculos en la obtención de cultivares resistentes, ha sido la falta de un método estandarizado para la evaluación de la resistencia; por lo que frecuentemente el nivel de resistencia se decide sólo por la severidad de los síntomas inducidos por el virus. Sin embargo, la edad de las plantas en el momento de la inoculación, la presión de inóculo y las condiciones de crecimiento pueden tener un efecto mayor sobre la severidad de los síntomas de la enfermedad.

Por otra parte, para poder basar el criterio de resistencia en el conocimiento del efecto de la infección del TYLCV-IL [CU] sobre el rendimiento y sus componentes, y no sólo en los síntomas de la enfermedad y el contenido de ADN viral, se debe comparar plantas no inoculadas con inoculadas, lo cual permitirá conocer el rendimiento potencial de los genotipos estudiados. Ello conlleva a la ejecución de experimentos costosos que demandan mucho tiempo, y a los que sólo pueden someterse genotipos promisorios y no poblaciones segregantes.

3.3.2.5. Severidad e incidencia del TYLCV-IL [CU] después de la infección mediante injerto

Las líneas LD3, LD4, LD5 y LD6 no mostraron síntomas de la enfermedad durante todo el período del ensayo, lo que sugiere su resistencia a la multiplicación viral (Boissot Nathalie. INRA-Guadalupe. 2003. Com. personal). En la figura 10 se

muestra la línea LD4 asintomática al TYLCV-IL[CU] después de la infección mediante injerto.



Figura 10. Planta de la línea LD4 en condiciones de aislador, injertada con un vástago enfermo, procedente de la variedad susceptible Campbell 28. A la derecha se indica el vástago con síntomas severos del TYLCV-IL [CU]

Czosnek y col., (1988) demostraron que una vez introducido el virus en la planta, éste se multiplica rápidamente propagándose a través del floema, lo que provoca el rápido desarrollo de los síntomas. Por su parte, Fargette y col., (1996) informaron, por primera vez, que LA1969 fue completamente resistente al TYLCV-IL [CU], cuando realizaron la inoculación por injerto.

Los testigos ARO 8479, tolerante, y HA 3108, altamente tolerante, mostraron síntomas ligeros y muy ligeros, respectivamente, a los 45 y 60 ddi por injerto, en el 100% de las plantas; más tardíos por tanto que en el testigo susceptible Campbell 28, cuyas plantas mostraron síntomas de amarillamiento y encrespamiento severo a los 20 ddi en el 100% de las plantas.

Friedmann y *col.*, (1998) inocularon por injerto, infectado con el TYLCV-IL, la línea resistente TY172, la cual no mostró síntomas de la enfermedad a los tres meses después de la inoculación, mientras que el testigo susceptible, la línea L27, mostró síntomas severos 10 ddi por injerto.

3.3.2.6. Metodología propuesta para la evaluación de la resistencia al TYLCV-IL [CU] en condiciones de Cuba

En el presente trabajo se propone una metodología de evaluación de la resistencia al TYLCV-IL [CU], la cual puede constituir una herramienta útil para los mejoradores que se ocupan de este tema en las condiciones cubanas. En la figura 11 se muestra el esquema general de la metodología de trabajo propuesta.

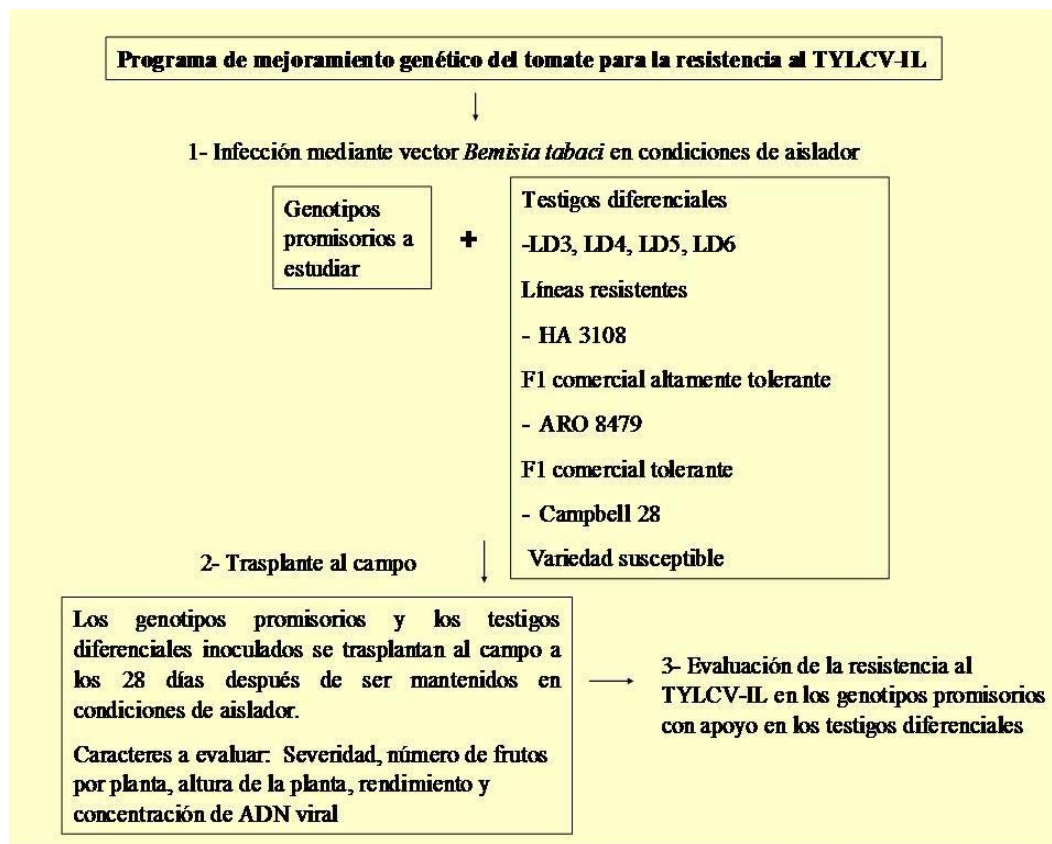


Figura 11. Esquema general de la metodología de trabajo propuesta para la evaluación de la resistencia al TYLCV-IL [CU]

La metodología propuesta para la evaluación de la resistencia al TYLCV-IL [CU] consta de los aspectos siguientes:

3.3.2.6.1. Infección mediante vector *Bemisia tabaci* en condiciones de aislador

Material vegetal

Los materiales promisorios procedentes de un programa de mejoramiento genético para la resistencia al TYLCV-IL [CU] se deben sembrar junto con los testigos diferenciales que se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Testigos diferenciales propuestos y su procedencia.

Testigos diferenciales	Procedencia
LD3	IIHLD, Cuba. Se puede emplear los cuatro genotipos o uno de ellos.
LD4	
LD5	
LD6	
HA 3108	Híbrido F ₁ comercial altamente tolerante al TYLCV-IL (Hazera Genetics, Brurim, Israel).
ARO 8479	Híbrido F ₁ comercial tolerante al TYLCV-IL (Hazera Genetics, Brurim, Israel).
Campbell 28	Cultivar comercial susceptible al TYLCV-IL (EE.UU.) (Moore, 1971)

Material viral

Como fuente primaria de inóculo se utilizan plantas del cultivar susceptible Campbell 28 infectadas por el TYLCV-IL [CU]; lo cual se debe confirmar mediante el diagnóstico molecular. El inóculo se mantiene en plantas de dicha variedad en condiciones de aislador. En la figura 12 se muestra como pueden ser las jaulas para el mantenimiento de las plantas infectadas por el TYLCV-IL [CU].



Figura 12. Tipo de jaula con estructura de madera y cubierta con tela anti *Bemisia* que puede utilizarse para el mantenimiento de las plantas infectadas por el TYLCV-IL [CU].

Método de inoculación mediante vector

Para realizar la infección mediante vector se emplean adultos de *Bemisia tabaci*, obtenidos a partir de ninfas, las cuales se transfieren a plantas de tomate del cultivar susceptible Campbell 28, infectadas con el TYLCV-IL [CU].

Las plantas se mantienen en condiciones de aislador con tela anti *Bemisia*, a una temperatura promedio de 28/24°C (día/noche) y 80 +/- 10% de humedad relativa. Los insectos se alimentan de estas plantas hasta que se utilizan en el ensayo de transmisión viral.

Los genotipos promisorios y los testigos diferenciales, al estado de emisión del segundo par de hojas verdaderas, se infectan con moscas blancas virulíferas. El período de acceso a la inoculación es de 48 horas, al final las plantas se asperjan con Imidacloprid (Confidor®, Bayer) para eliminar los insectos y garantizar que la inoculación sea sólo durante 48 horas. Para asegurar el 100% de infección se utilizan 50 insectos por planta (Lapidot y col., 1997).

En la figura 13 se muestra el instrumento que se utiliza para colectar los insectos infectados por el TYLCV-IL y poder, de ésta forma, transferirlos al material vegetal que se necesita inocular, en este caso los genotipos promisorios y los testigos diferenciales, los cuales se encuentran en condiciones de aislador.



Figura 13. Instrumento para coleccionar las moscas blancas virulíferas que se encuentran en plantas infectadas y transferirlas hacia el material vegetal que se desea inocular.

3.3.2.6.2. Trasplante al campo

Los genotipos promisorios y los testigos diferenciales inoculados mediante vector se trasplantan al campo a los 28 días después de ser mantenidos en condiciones de aislador.

- Caracteres a evaluar:

- Severidad: Valor promedio de síntomas de la enfermedad mostrado por cada individuo a los 55 días después de la infección por vector, según la escala propuesta por Scott y Schuster (1991), donde:
 0= ausencia de síntomas de la enfermedad
 1= síntomas ligeros de amarillamiento que se observan luego de un análisis cuidadoso
 2= síntomas de amarillamiento de las hojas apicales que se observan con facilidad
 3= síntomas de amarillamiento de las hojas apicales que curvan sus bordes hacia arriba, observados en una parte de la planta

4= síntomas de amarillamiento de las hojas apicales que curvan sus bordes hacia arriba, con aspecto similar al de una cuchara, se observa enanismo de las plantas.

- Altura de la planta (cm)
- Número de frutos por planta y rendimiento expresado en kilogramos por planta (Kg/pl), calculado como el número de frutos por planta por la masa promedio de los frutos (se evalúa en el momento de la cosecha).
- Concentración de ADN viral

Para realizar la cuantificación del ADN viral, se muestrea al azar el 60% de las plantas de cada genotipo promisorio y los testigos diferenciales propuestos. Se colecta la segunda hoja abierta de la región apical de la planta a los 55 días después de la inoculación por vector. Se aplica el método de HAN-NR lo que permite detectar la presencia del virus en concentraciones muy bajas; según la metodología propuesta por Quiñones y *col.*, (2004).

3.3.2.6.3. Evaluación de la resistencia al TYLCV-IL [CU] en los genotipos promisorios con apoyo en los testigos diferenciales

En la tabla 19 se muestra el criterio de evaluación para la resistencia al TYLCV-IL [CU]. El procedimiento consiste en evaluar los genotipos promisorios del programa de mejoramiento, a partir de los testigos diferenciales propuestos en este trabajo de tesis.

Tabla 19. Criterio de evaluación para la resistencia al TYLCV-IL [CU] a partir de los testigos diferenciales.

Testigo diferencial	Severidad* (55 ddi)	Altura (cm)	Número de frutos por planta	Rendimiento (Kg/pl)	Contenido ADN viral (ng/μl)**	Clasificación propuesta
Líneas LD	0	No reducción	No reducción	No reducción $\geq 2,65$	$\leq 1,00$	Resistente
HA 3108	0	No reducción	No reducción	No reducción	$\geq 1\ 000$	Altamente tolerante
ARO 8479	2,2	Reducción	No reducción	No reducción	$\geq 1\ 000$	Tolerante
Campbell 28	3,5	Mayor reducción (29 %)	Alta reducción (80 %)	Alta reducción (80 %)	$\geq 1\ 000$	Susceptible

* Escala (0-4) Scott y Schuster (1991) ddi: días después de la inoculación por vector

** nanogramos /microlitro Quiñones y col., (2004)

3.4. Etapa 3. Caracterización de las nuevas fuentes de resistencia obtenidas, mediante marcadores moleculares asociados al gen *Ty-1* proveniente de *S. chilense* LA1969 (genotipificación molecular)

3.4.1. Materiales y métodos

3.4.1.1. Material vegetal

En las líneas de la generación S9, se realizó la genotipificación molecular con los marcadores tipo RFLP informados por Zamir y col., (1994) asociados al gen *Ty- 1*. Se utilizó el mapa genético de alta densidad para el cultivo del tomate (Tanksley y col., 1992)

En la tabla 20 se relaciona el material vegetal empleado, sus características y su procedencia.

Tabla 20. Material vegetal, características y procedencia.

Genotipo	Características	Procedencia
LD3 LD4 LD5 LD6	Líneas de la generación S9	IIHLD, Cuba.
<i>S. chilense</i> LA 1969	Especie silvestre, presenta el gen <i>Ty-1</i> de resistencia al TYLCV-IL	INRA-Avignon, Francia
TY52	Línea que presenta la introgresión de <i>S. chilense</i> LA 1969.	Universidad Hebrea de Jerusalén, Israel.
TY50	Línea hermana susceptible que no presenta la introgresión de <i>S. chilense</i> LA 1969.	
Fiona	Híbrido F ₁ comercial tolerante al TYLCV-IL	S & G Sandoz, Holanda
HA 3105	Híbrido F ₁ comercial altamente tolerante al TYLCV-IL	Hazera Genetics, Israel
13/8/2	Línea susceptible al TYLCV-IL	IIHLD, Cuba.
Campbell 28	Variedad comercial susceptible al TYLCV-IL	EE.UU. (Moore, 1971)

Las muestras del tejido foliar se tomaron a los 17 días después del trasplante. Estas se trasladaron al Departamento de Bioplasmas del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), en el año 2003, donde se liofilizaron y se mantuvieron en condiciones de baja temperatura (-20°C), hasta la extracción del ADN genómico.

3.4.1.2. Análisis RFLP

El ADN genómico total de cada genotipo se extrajo según el procedimiento propuesto por Hoisington (1992). Las muestras de ADN purificadas se digirieron separadamente con las enzimas de restricción *Dra* I y *Hind* III según las recomendaciones del fabricante (Amersham). El proceso de digestión se realizó

según el protocolo utilizado en el Laboratorio de Biología Molecular del INRA-Avignon (1997).

La separación de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% en buffer TAE (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM). La transferencia a membrana de nylon (Hybond N⁺, Amersham) se realizó según el procedimiento alcalino NaOH 0,4 N. La hibridación y autorradiografía se realizaron empleando los protocolos del Laboratorio de Biología Molecular del INRA-Avignon (1999).

Se utilizaron las sondas genómicas TG97 y TG297, pertenecientes al grupo 6 de ligamiento, suministradas por el Profesor Dr. Steven Tanksley de la Universidad de Cornell, EE.UU. (figura 14).

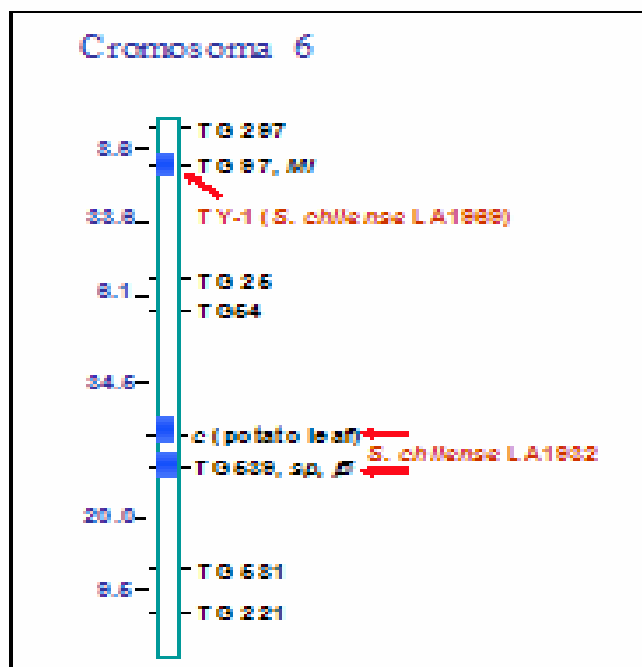


Figura 14. Ubicación de los marcadores TG97 y TG297 sobre el cromosoma 6. En la parte superior de la figura se señala el marcador TG97, próximo al gen *Ty-1*. Cortesía del Dr. Peter Hanson, AVRDC, Taiwan.

Las sondas fueron amplificadas por un procedimiento estándar de PCR. Se emplearon cuatro combinaciones enzima-sonda. En la tabla 21 se observa sus características.

Tabla 21. Enzimas y sondas utilizadas.

Enzima	Sonda	Peso molecular (pares de base, pb)
<i>Dra</i> I y <i>Hind</i> III	TG 297	2500
<i>Dra</i> I y <i>Hind</i> III	TG 97	1100

3.4.2. Resultados y discusión

Los resultados de la genotipificación molecular mostraron que de las cuatro combinaciones enzimas-sondas evaluadas sólo una de ellas (*Dra*I-TG97) mostró polimorfismo en los materiales estudiados, lo que indica diferencias entre los genotipos. El marcador TG97 reveló la presencia de dos bandas: la primera en posición de migración cercana a los 1636 pb, presente en las líneas LD3, LD4 y LD5 así como en los testigos *S. chilense* LA1969 y TY52; la segunda, con una posición de migración cercana a los 1018 pb, presente en los genotipos susceptibles (figura 15).

La banda observada en los genotipos susceptibles sugiere la presencia de una variante molecular alélica no asociada a la resistencia al TYLCV-IL [CU] en nuestras condiciones.

El híbrido altamente tolerante HA 3105 y la línea LD6, mostraron la banda de 1018 pb, presente en los genotipos susceptibles. Esto indica que la fuente genética que condiciona su resistencia debe estar localizada en otra parte del genoma, alejada del marcador utilizado, lo cual infiere que estos cultivares provienen de otra fuente silvestre de resistencia.

El híbrido Fiona, mostró ambas bandas lo que indica el estado heterocigótico para la región asociada al marcador TG97, y por tanto, el polimorfismo molecular para dicha zona entre los progenitores.

Los resultados obtenidos confirman la presencia del gen *Ty-1*, de dominancia incompleta, en las líneas cubanas LD3, LD4 y LD5 y el origen de dicha resistencia en la fuente silvestre *S. chilense* LA1969 (Piñón y col., 2005), también presente en TY52, homocigótica para el locus *Ty-1* (Zamir y col., 1994).

Igualmente, se asevera los resultados obtenidos por Zamir y col., (1994) en relación a la alta asociación del marcador TG97 con el gen *Ty-1*. Michelson y col., (1994) plantean que el gen *Ty-1* está asociado con la inhibición de los síntomas de la enfermedad. En condiciones de bajo nivel de inóculo, la acumulación del ADN viral se reduce significativamente y a alto nivel de inóculo, se limita el movimiento del virus a larga distancia.

Estos resultados evidencian la utilidad del marcador TG97 para su empleo en el estudio de posibles fuentes de resistencia del banco de germoplasma con fines de incorporarlas según una estrategia de pirimidización; así como para la selección asistida de los portadores durante las generaciones segregantes en los programas de mejoramiento.

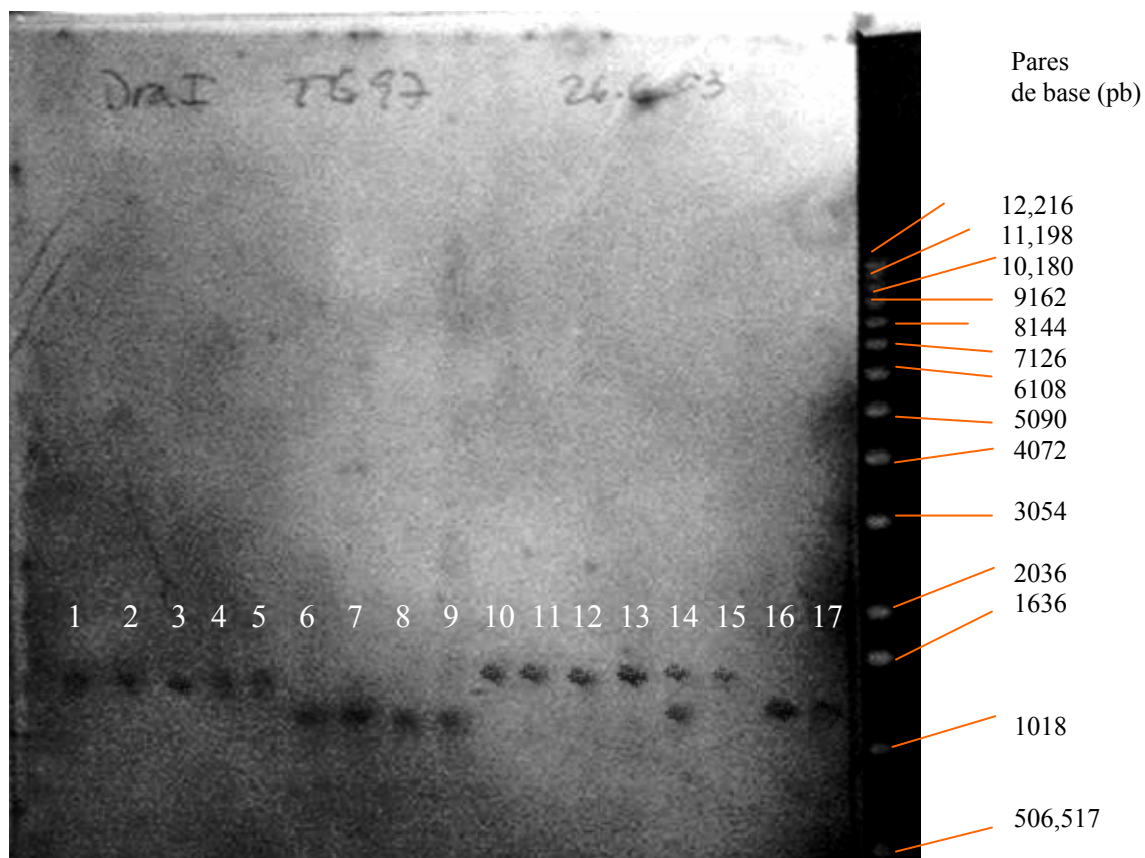


Figura 15. Resultados de la genotipificación molecular de los cultivares con la combinación enzima-sonda *Dra I*/ TG-97

Leyenda:

- 1- LA 1969, 2- LA 1969, 3- TY52, 4- TY52 y 5- TY52
- 6- TY50, 7- TY50, 8- LD 6 y 9- 13-8-2
- 10- LD 3, 11- LD 5, 12- LD 5 y 13- LD 4
- 14- Fiona, 15- LD 5, 16- HA 3105 y 17- Campbell 28

El incremento del nivel de resistencia a begomovirus en el mundo se podrá obtener por la combinación de diferentes resistencias en un solo cultivar; para lograr el éxito, es necesario combinar los genes de resistencia a distintos virus. Por ello, es importante distinguir los genes en los genotipos resistentes, lo cual puede efectuarse por la caracterización mediante marcadores moleculares (Lapidot y Polston, 2006; Xue-Yu y col., 2007).

En la actualidad, además de lo señalado para el gen *Ty-1*, están disponibles marcadores moleculares tipo RFLP para la identificación del gen *Ty-2*, localizado en el brazo largo del cromosoma 11. Este gen fue introgresado en la línea H24, a partir de *S. habrochaites* (Hanson y col., 2006). Se utiliza, además, marcadores basados en PCR (CAPS, Cleavage Amplified Polymorphic Sequences), asociados al gen *Ty-1*, que muestran polimorfismo para las introgresiones de *S. habrochaites* (AVRDC, 2002; Pérez de Castro y col., 2007b).

Recientemente, se informó un locus de resistencia a begomovirus, *Ty-3*, localizado sobre el brazo largo del cromosoma 6, mediante la utilización de marcadores basados en PCR (SCAR, Sequence Characterized Amplified Region markers). Este locus fue introgresado en líneas avanzadas de tomate, en Florida, EE.UU., provenientes de un cruzamiento con *S. chilense*, accesiones LA2779 y LA1932 (Ji y Scott, 2006; Ji y col., 2007). Los autores identificaron un segmento largo (27 cM) introgresado de LA2779 y uno más corto (6cM) introgresado de LA1932. Con el estudio de una progenie F₂, se pudo evidenciar que el locus *Ty-3* explica el 65% de la varianza para la resistencia al TYLCV, y el 30% para la resistencia al Virus del moteado del tomate [*Tomato mottle virus* (ToMoV)].

El locus *Ty-3* pudiera estar presente en otras especies silvestres. Ji y col., (2007) informaron que en líneas avanzadas derivadas de *S. peruvianum* y *S. habrochaites*, que presentaron un alto nivel de resistencia a begomovirus bipartitos en Guatemala, encontraron una introgresión asociada al locus *Ty-3*.

3.5. Etapa 4. Recomendación de variedades comerciales y líneas resistentes al TYLCV [CU]

3.5.1. Estabilidad del rendimiento en época óptima y primavera

3.5.1.1. Materiales y métodos

Los ensayos se desarrollaron en áreas del IIHLD, en las épocas de siembra óptima y primavera de los años 2002 y 2003. Se realizaron cuatro cosechas de frutos totales y se evaluó el carácter rendimiento (Kg/pl).

3.5.1.1.1. Diseño experimental y procesamiento estadístico

Veinticinco plantas de cada genotipo: LD3, LD4, LD5, LD6 y Campbell 28 (C28) se distribuyeron en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones.

Para la determinación de las fuentes de interacción genotipo por ambiente se realizó un análisis de varianza de tres factores (año x época de siembra x genotipo). Se empleó el programa Statgraphics versión 5 para Windows.

Se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$) para la comparación de las medias. Después de detectar la existencia de interacción, se procedió a conocer el grado de estabilidad de los genotipos al ser probados en diferentes ambientes, mediante la aplicación de un modelo de efectos aditivos principales e interacción multiplicativa (AMMI) (Gauch, 1988). Para ello se consideraron los cinco genotipos y los cuatro ambientes (A1, A2, A3 y A4), éstos últimos formados por las combinaciones siguientes de época de siembra por año:

A1: época de siembra óptima-año 2002

A2: época de siembra de primavera-año 2002

A3: época de siembra óptima-año 2003

A4: época de siembra de primavera-año 2003.

Para aplicar el modelo AMMI se confeccionó matriz Z de orden $i \times j$ con los valores medios de los genotipos y los ambientes dispuestos en filas y columnas.

La matriz Z se exportó al programa denominado GGEbiplot para Windows, versión 4.1 (Yan, 2001).

Al realizar la descomposición en valores singulares de Z queda la expresión siguiente:

$$Z_{ij} = \sum_{m=1}^M \lambda_m u_{mi} v_{mj}$$

Siendo M el rango de Z .

Cuando la interacción genotipo por ambiente es modelada bilinealmente, se expresa de la forma siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \sum_{m=1}^M \lambda_m u_{mi} v_{mj} + \varepsilon_{ij} \quad [1]$$

Se llama modelo AMMI de orden M a la expresión [1]

Donde: Y_{ij} : valor observado del rendimiento del genotipo i en el ambiente

μ : media general

α_i : efecto del i -ésimo genotipo

β_j : efecto del j -ésimo ambiente

λ_m : corresponde al valor singular de orden m de $Z'Z$

u_{mi} : coordenada i -ésima del vector singular de $Z'Z$ asociado a λ_m

v_{mj} : coordenada j -ésima del vector singular de $Z'Z$ asociado a λ_m

ε_{ij} : término de error del genotipo i en el ambiente j

Los resultados se interpretaron a partir de un gráfico Biplot donde se plotearon en un subespacio reducido los cinco genotipos (LD3, LD4, LD5, LD6 y C28) y los cuatro

ambientes (A1, A2, A3 y A4), a través del programa GGEbiplot. La representación gráfica permitió evaluar la estabilidad de los genotipos en los ambientes e identificó el mejor cultivar en cada ambiente estudiado. El programa permitió visualizar en el gráfico los Componentes Principales (CP), referidos a un Biplot de PC1 vs. PC2, que explicaron el porcentaje de la variación del rendimiento debido a la interacción genotipo por ambiente.

3.5.1.2. Resultados y discusión

Los resultados del análisis de varianza de tres factores (año x época de siembra x genotipo) se presentan en el Anexo 3. Los efectos principales época de siembra (B) y genotipo (C) fueron significativos; no así el año (A). La interacción época de siembra por genotipo (BC) fue significativa ($P \leq 0,05$). Ello justifica el ajuste de un modelo AMMI.

En la tabla 22 se muestra la comparación de las medias del rendimiento para la interacción genotipo por ambiente mediante la prueba de rango múltiple de Tukey al 5%.

Tabla 22. Comparación de las medias del rendimiento de la interacción genotipo por ambiente.

Genotipo /ambiente	Rendimiento (Kg/pl)	
LD6 A1	3,5775	a
LD6 A3	3,5275	a
LD3 A3	3,2650	ab
LD3 A1	2,8500	abc
LD4 A1	2,5975	bcd
LD3 A4	2,5700	bcd
LD4 A3	2,5475	bcd
LD6 A2	2,5350	bcde
LD4 A4	2,5025	bcde
LD5 A3	2,4800	bcde
LD4 A2	2,4200	bcde
LD6 A4	2,3050	cde
LD5 A1	2,2275	cde
LD3 A2	2,1675	cde
LD5 A4	1,9400	de
LD5 A2	1,6925	ef
C28 A3	0,9575	fg
C28 A1	0,9475	fg
C28 A4	0,4425	g
C28 A2	0,4175	g

Medias sin letras en común difieren $P \leq 0,05$ según la prueba de rango múltiple de Tukey.

A1: época de siembra óptima-año 2002

A2: época de siembra de primavera- año 2002

A3: época de siembra óptima- año 2003

A4: época de siembra de primavera- año 2003.

La línea LD6, superó el rendimiento de las restantes líneas resistentes al TYLCV-IL[CU] en época de siembra óptima para el cultivo, ambientes A1 y A3, sin diferencias significativas con la línea LD3 en estos ambientes; lo que sugiere la conveniencia de la explotación de las mismas en ésta época en condiciones similares a las del presente trabajo (tabla 22).

Es de resaltar que las cuatro líneas LD obtenidas mostraron un rendimiento aceptable en época de siembra de primavera, el cual osciló entre 1,69 y 2,57 Kg/pl en comparación con la variedad testigo susceptible Campbell 28 que alcanzó entre 0,41

y 0,44 Kg/pl en primavera (tabla 22). Esta variedad mostró los rendimientos más bajos, en los cuatro ambientes A1, A2, A3 y A4.

La figura 16 muestra la representación Biplot en los dos primeros componentes principales, CP1 y CP2, que explican el 99,5% de la variación total del rendimiento debido a la interacción genotipo por ambiente con una contribución respectiva del 73,7% y el 25,8%.

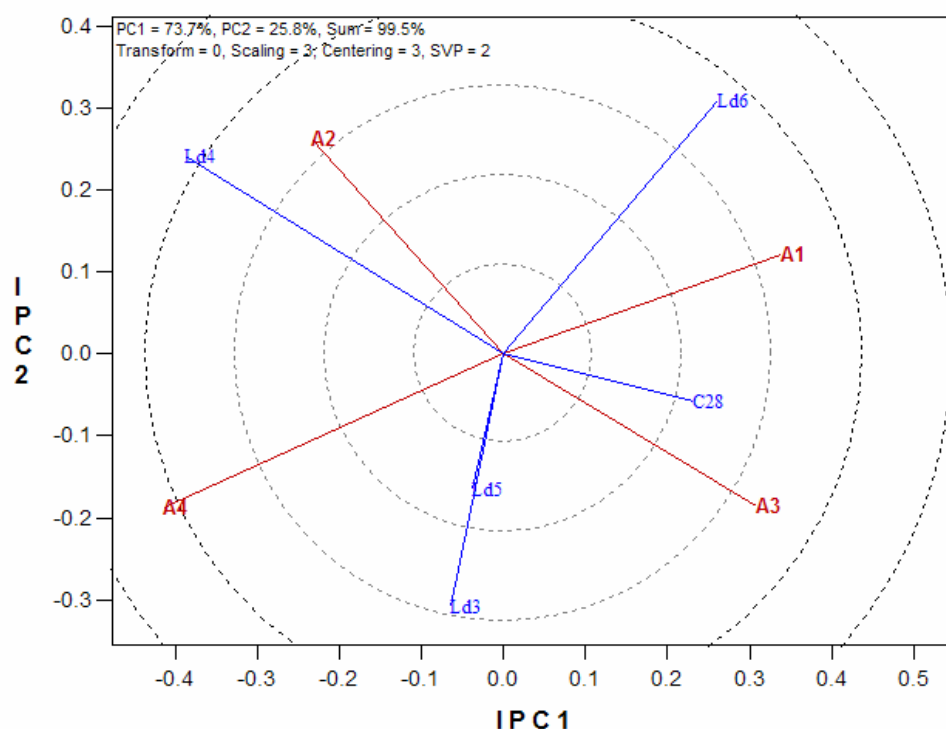


Figura 16. Gráfico Biplot generado por el ajuste del modelo AMMI. En el eje de las abscisas y ordenadas se representan los valores de los marcadores de genotipos y ambientes en los dos primeros Componentes Principales, PC1 y PC2. En la parte superior izquierda de la figura se muestra el porcentaje de variación en el rendimiento debido a la interacción genotipo por ambiente que explica cada componente. Los cinco genotipos se representan en azul y los cuatro ambientes en rojo.

A1: época de siembra óptima-año 2002
A2: época de siembra de primavera-año 2002
A3: época de siembra óptima-año 2003
A4: época de siembra de primavera-año 2003.

La representación Biplot permite destacar que:

- No hubo una tendencia de los genotipos a formar grupos, lo cual indica patrones de respuesta diferentes a través de los ambientes estudiados.
- Los ambientes escogidos permitieron la diferenciación de los genotipos en relación con el rendimiento, ya que se observa que todos están alejados del origen de las coordenadas, es decir, que aportan a la interacción estudiada.
- La posición distal de la línea LD6 en el extremo superior derecho (próxima al ambiente A1 y separada de las demás), debido a su elevado rendimiento en la época de siembra óptima para el cultivo en el año 2002 (3,57 Kg/pl), lo cual contribuye a la interacción estudiada. Esto puede constituir una evidencia confirmatoria de los resultados obtenidos en el estudio de genotipificación molecular en relación con la presencia de otros mecanismos de resistencia diferentes a los asociados al gen *Ty-1*, ausente en esta línea y expresado en las líneas LD3, LD4 y LD5.
- La posición distal del genotipo LD4 en el extremo superior izquierdo, próximo al ambiente A2 (época de siembra de primavera del año 2002), alejada de las restantes líneas portadoras del gen *Ty-1*, debido al rendimiento exhibido por el mismo en dicha época (2,42 Kg/pl).
- La diferenciación para el rendimiento de la línea LD3 ambiente A3 (3,26 Kg/pl), época de siembra óptima del año 2003, y ambiente A4 (2,57 Kg/pl), época de siembra de primavera del año 2003. Este último el más alto alcanzado en esta época.

- La estabilidad de la línea LD5, denominada Vyta, ya que al estar más próxima al origen de coordenadas, fue la de menor respuesta a los ambientes de expresión del rendimiento. Lo que sugiere la conveniencia de su explotación en la provincia de La Habana en condiciones similares a las del presente trabajo.
- La estabilidad de la variedad Campbell 28 confirma su susceptibilidad al TYLCV-IL [CU] y, por tanto, la superioridad sobre ella de las líneas LD resistentes obtenidas.

González y *col.*, (2007) compararon tres métodos para estimar la estabilidad del rendimiento en variedades de algodón y concluyeron que el modelo AMMI permitió asociar la respuesta de las variedades mas productivas a ambientes específicos y resultó ser mas informativo y sencillo de interpretar.

Sueiro y *col.*, (2003) luego del estudio de la línea LD5 (Vyta), en tres ambientes diferentes de la provincia Granma, recomendaron generalizar su uso a todas las áreas productoras de tomate de la misma, por presentar niveles mínimos de severidad e incidencia del TYLCV-IL [CU] en el período crítico del cultivo, mostrar un incremento del rendimiento de 8 a 14 t/ha con respecto a la variedad tradicional Campbell 28 y ofrecer ganancias a las empresas por este concepto. Huerres (2002) hizo igual recomendación para la provincia de Villa Clara, después de estudiar dicha variedad en dos ambientes y Nápoles (2006) la valoró en Camagüey con resultados favorables. Actualmente, esta variedad se encuentra ampliamente distribuida en Cuba, donde representa el 38% de la estructura de siembra del tomate (Cuba, MINAGRI, 2008).

En la figura 17 se muestra una plantación de la variedad de tomate Vyta en el predio de un productor de tomate, en el municipio de Morón, provincia de Ciego de Ávila.



Figura 17. Plantación de la variedad de tomate Vyta, finca "La Conejera", municipio de Morón, provincia Ciego de Ávila.

3.5.2. Efectividad de la resistencia en ausencia de plaguicida químico para el control del TYLCV-IL [CU]

3.5.2.1. Materiales y métodos

Para conocer el efecto del TYLCV-IL [CU] en la línea LD5 (Vyta) y el cultivar susceptible Campbell 28, con el uso o no de plaguicidas químicos, se realizó un experimento en el IIHLD en el mes de noviembre de los años 2002 y 2003. La protección química contra el vector consistió en el uso de Imidacloprid (Gaucho y Confidor), 70 g/kg de semilla y 0,5 Kg/ha, respectivamente, y Endosulfan (2 kg/ha).

El manejo agronómico de las plantaciones se efectuó según el Instructivo Técnico vigente para este cultivo (Cuba, MINAGRI, 1984).

Se evaluaron los caracteres severidad e incidencia de la enfermedad a los 60 días después del trasplante (ddt); así como el rendimiento (Kg/pl).

3.5.2.1.1. Diseño experimental y procesamiento estadístico

25 plantas de la variedad Vyta y 25 plantas de Campbell 28 se distribuyeron al azar y replicaron tres veces; éstas se trataron con plaguicidas químicos. Un número similar de plantas, con igual distribución y separadas 10 metros de las anteriores, se mantuvieron sin aplicación de plaguicidas químicos. Cada área experimental fue rodeada de un borde de plantas de la variedad Vyta. Las medias para cada tratamiento, por genotipo, se compararon mediante la prueba de t-test para $P \leq 0,05$.

3.5.2.1.2. Cálculo del efecto económico por eliminación de plaguicidas químicos

El cálculo del efecto económico por eliminación de plaguicidas químicos en la variedad Vyta se realizó según Tzokov y col., (1987), en función de la reducción del costo de producción por este concepto. En el mismo se utilizaron los datos suministrados por el Grupo Empresarial de Cultivos Varios (GECV) del MINAGRI.

La fórmula usada fue:

Reducción costo producción por eliminación de plaguicidas = $(Ca - Cn) - (Va - Vn)$

Donde:

Ca – Costo de la producción variante anterior (aplicación de plaguicidas químicos)

Cn – Costo de la producción variante nueva (no aplicación de plaguicidas químicos)

Va – Valor de la producción variante anterior (aplicación de plaguicidas químicos)

Vn – Valor de la producción variante nueva (no aplicación de plaguicidas químicos)

En este trabajo de tesis, se asume que el valor de la producción es igual en las dos variantes; luego: $V_a - V_n = 0$

3.5.2.2. Resultados y discusión

El efecto del TYLCV-[CU], expresado por los síntomas de la enfermedad, no se observó en la variedad Vyta, con aplicación y sin aplicación de plaguicidas; lo que demuestra su independencia de la aplicación de productos químicos frente al vector; sin embargo, la variedad susceptible Campbell 28 mostró síntomas severos (tabla 23).

Tabla 23. Efecto del TYLCV-IL [CU] en los cultivos Vyta y Campbell 28 con el uso o no de plaguicidas químicos a los 60 ddt

Cultivar	Severidad*	Incidencia
Sin plaguicidas químicos		
Vyta	0,00	0,00
Campbell 28	3,90±0,06	100
Plaguicidas químicos		
Vyta	0,00	0,00
Campbell 28	3,87±0,08	100

*Escala (0-4) Scott y Schuster (1991)

Estos resultados reflejan la importancia de la adopción de cultivos de tomate resistentes al TYLCV en condiciones de alta infección viral. Vidavsky y Czosnek (1998) informaron, en Israel, la independencia del comportamiento de líneas de tomate resistentes al TYLCV-IL, a la aplicación de insecticidas o a la protección física con mallas anti-*Bemisia*.

Ante la emergencia de nuevos begomovirus, la aplicación de productos químicos con el objetivo de eliminar el vector antes de que este transmita el virus, se ha hecho de forma intensiva; sin embargo, se ha demostrado que *Bemisia* puede desarrollar resistencia a los pesticidas, además del efecto nocivo de estos productos en el deterioro del medio ambiente (Palumbo y col., 2001; Rojas y col., 2005).

El rendimiento de la variedad Vyta mostró valores altos cuando se aplicó plaguicida químico y cuando éste no se aplicó (3,30 y 3,35 Kg/pl, respectivamente). La variedad susceptible Campbell 28, se vio afectado fuertemente por el TYLCV-IL [CU] (1,08 y 1,00 Kg/pl, respectivamente) (tabla 24).

Tabla 24. Efecto sobre el rendimiento del uso o no de plaguicidas químicos para el control del TYLCV-IL [CU] en los cultivares Vyta y Campbell 28

Cultivar	Rendimiento (Kg/pl)	
	Plaguicidas químicos	Sin plaguicidas químicos
Vyta	3,30 a	3,35 a
Campbell 28	1,08 b	1,00 b

a,b: medias de tratamientos no difieren entre sí según prueba de t-test $P \leq 0,05$

Los resultados muestran que en el caso de las variedades susceptibles al TYLCV-IL, como Campbell 28, la aplicación de plaguicidas químicos no alcanzó a mejorar su comportamiento productivo frente a la enfermedad. Es por ello que numerosos autores plantean que el mejor método para reducir las pérdidas en el rendimiento provocadas por el TYLCV, es el mejoramiento de cultivares resistentes o tolerantes al virus (Pico y col., 1996; Morales, 2001; Lapidot y Friedmann, 2002; Gómez y col., 2004; Mejía y col., 2005).

3.5.2.2.1. Efecto económico por eliminación de plaguicidas químicos

El efecto económico que brinda la utilización de la variedad Vyta para el control del TYLCV-IL [CU], es de 44,28 USD/ha, como se muestra a continuación:

2 441* USD/ha (costo de producción de la variante anterior)

2 397* USD/ha (costo de producción de la variante nueva)

Efecto económico = 2 441* USD/ha - 2 397* USD/ha = 44 USD/ha

* Datos suministrados por la Oficina de Precios del MINAGRI (campaña 2007/2008). En la variante nueva, se elimina el empleo de Imidacloprid (Gaucho y Confidor) y

Endosulfán, según lo establecido para el tomate (Piñeiro Francisco. GECV. 2004. Com. Personal).

La creación de nuevas variedades es un reto agroambiental. El objetivo final actual es el de evitar el uso de pesticidas y conlleva a un proceso de innovación. La innovación varietal, por tanto, puede definirse como un proceso evolutivo largo y continuo, que parte de la idea de investigar, y llega hasta el logro de la transferencia de soluciones a los beneficiarios (Salmon, 2006).

3.5.3. Evaluación del comportamiento de las nuevas líneas obtenidas ante el TYLCV-Mld [RE]

3.5.3.1. Materiales y métodos

Para conocer la respuesta de las cuatro líneas que habían sido estudiadas frente al TYLCV-IL [CU], ante el TYLCV-Mld [RE], miembro de los begomovirus que afectan el tomate en el Mediterráneo y África, se procedió a evaluar la severidad e incidencia de la enfermedad en condiciones de infección artificial por injerto y vector, mediante las metodologías establecidas por Delatte (2005).

El trabajo se desarrolló en el Polo de Protección de Plantas del Centro de Cooperación Internacional de Investigación Agrícola para el Desarrollo (CIRAD), ubicado en la isla Reunión, Departamento Francés de Ultramar, en el océano Índico; se realizaron dos ensayos: ensayo I, octubre - diciembre 2005 y ensayo II, diciembre 2005 – febrero 2006.

3.5.3.1.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado y su procedencia se muestran en la tabla 25.

Tabla 25. Material vegetal utilizado y su procedencia.

Genotipo	Procedencia
LD 3	Líneas de la generación S9 (IIHLD, Cuba)
LD 4	
LD 5	
LD 6	
TY172	Línea resistente al TYLCV, proveniente de <i>S. peruvianum</i> , (Friedmann y col., 1998), denominada STY-7 (Lapidot y col., 2006) Centro Volcáni, Israel
R13	Línea susceptible, denominada STY-1 (Lapidot y col., 2006) (Hazera Genetics, Brurim, Israel)
13-8-2	Línea susceptible al TYLCV (IIHLD, Cuba)
Farmer	Híbrido F ₁ comercial susceptible al TYLCV (Know Your Seed Co.)

3.5.3.1.2. Material viral

El inóculo viral procedió del TYLCV-Mld [RE], secuenciado en su genoma completo (Delatte, 2005). Como fuente primaria de inóculo se utilizaron plantas infectadas del cultivar Farmer, ello fue confirmado mediante la técnica TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay). El inóculo se mantuvo en plantas de esta variedad en condiciones controladas.

3.5.3.1.3. Método de inoculación mediante injerto

Diez plantas sanas por genotipo, de tres semanas de sembradas en macetas, se inocularon mediante injertos con yemas de plantas infectadas del cultivar Farmer, las que mostraban síntomas severos de la enfermedad (grado 7). Las plantas se mantuvieron en condiciones de aislador para observar el desarrollo de los síntomas (Delatte, 2005).

3.5.3.1.4. Método de inoculación mediante vector

Los adultos de *B. tabaci* se colectaron de una población de la isla Reunión y se mantuvieron en plantas de col (*Brassica oleracea* var *capitata*) en condiciones

controladas: 25 +/- 2°C temperatura y 60 +/- 10% humedad relativa. Las plantas de col con las ninfas del insecto, se transfirieron a jaulas que contenían plantas del cultivar Farmer, infectadas por el TYLCV-Mld [RE], estas se colocaron en un aislador con tela anti *Bemisia*. Los insectos se alimentaron de estas plantas hasta que se utilizaron en el ensayo de transmisión viral.

Para asegurar el 100% de infección, se usaron 15 moscas blancas por planta al estado de emisión del primer par de hojas verdaderas, el período de acceso a la inoculación fue de 72 horas, al final las plantas se asperjaron con Imidacloprid (Confidor®, Bayer), para eliminar los insectos y garantizar que la inoculación fuera sólo durante 72 horas, según la metodología utilizada. Se infectaron diez plantas por cada genotipo (Delatte, 2005).

3.5.3.1.5. Caracteres evaluados

Después de la inoculación por vector e injerto, las plantas se colocaron en condiciones de aislador para evaluar la severidad e incidencia de la enfermedad. Las evaluaciones se realizaron a los 28 y 56 días después de la inoculación (ddi).

Las evaluaciones individuales de los síntomas del TYLCV-Mld [RE], se hicieron cada 84 horas hasta los 56 ddi (Delatte, 2005), para determinar:

- Severidad: mediante una escala que contempló desde 1 (no síntomas) hasta 9 (muerte de la planta) (Delatte, 2005).
- Incidencia: porcentaje de plantas infectadas sobre el total.

La técnica TAS-ELISA, kit DSMZ, Alemania, se utilizó para comprobar la presencia o ausencia del ADN viral del TYLCV-Mld [RE], a los 56 ddi mediante vector e injerto; según el protocolo recomendado por el fabricante. Plantas infectadas del

cultivar susceptible Farmer fueron empleadas como controles positivos y como controles negativos plantas sanas del mismo cultivar. Se estimó la presencia viral cuando el valor de absorbancia fue al menos dos veces el del control negativo (Peralta y col., 1999). Esta técnica no permitió la cuantificación de la concentración viral en las plantas, por lo cual en este estudio sólo se determinaron las plantas asintomáticas.

3.5.3.1.6. Procesamiento estadístico

Se realizó un ANOVA de clasificación simple para conocer el efecto del genotipo a los 28 y 56 ddi mediante injerto y vector, para los caracteres severidad e incidencia. Se realizó la prueba de Student-Newman-Keuls para la comparación múltiple de las medias a una $P \leq 0,0001$. En el procesamiento de los datos se utilizó el programa SAS versión 8.1.

3.5.3.2. Resultados y discusión

3.5.3.2.1. Evaluación del efecto del TYLCV-Mld [RE] a los 28 días después de la inoculación mediante injerto y vector

A los 28 días después de la inoculación por injerto y vector se observó un efecto altamente significativo del genotipo ($P \leq 0,0001$), para la severidad e incidencia del TYLCV-Mld [RE]. No se observaron diferencias al interior de los grupos de las líneas y testigos susceptibles. Los resultados fueron similares en los dos experimentos realizados en años consecutivos (tabla 26).

Las líneas LD3, LD4, LD5, LD6 y TY172 no presentaron síntomas de la enfermedad. Por su parte, los testigos susceptibles, R13, 13-8-2 y Farmer, mostraron síntomas característicos del TYLCV-Mld [RE] después de la inoculación por injerto y vector (tabla 26).

Tabla 26. Severidad e incidencia del TYLCV-Mld [RE] por genotipo a los 28 días después de la inoculación mediante injerto y vector.

Genotipo	Injerto		Vector	
	Severidad*	Incidencia	Severidad*	Incidencia
LD3	1 b	0 b	1 b	0 b
LD4	1 b	0 b	1 b	0 b
LD5	1 b	0 b	1 b	0 b
LD6	1 b	0 b	1 b	0 b
TY172	1 b	0 b	1 b	0 b
Farmer	5,90 a	100 a	5,90 a	100 a
13-8-2	6,50 a	100 a	6,00 a	100 a
R-13	6,25 a	100 a	5,80 a	100 a

*Escala (1-9) Delatte (2005) a y b: significativo según la prueba Student-Newman-Keuls $P \leq 0.0001$

En la figura 17 se muestran la línea LD5 (Vyta) y el testigo susceptible Farmer, a los 28 ddi mediante vector.



Figura 17. Severidad del TYLCV-Mld [RE] a los 28 ddi mediante vector. A la izquierda se muestran plantas de la línea LD5 (Vyta) asintomáticas. A la derecha, el testigo susceptible Farmer con síntomas de la enfermedad

3.5.3.2.2. Evaluación del efecto del TYLCV-Mld [RE] a los 56 días después de la inoculación mediante injerto y vector

A los 56 días después de la inoculación por injerto y vector se observó un efecto altamente significativo del genotipo ($P \leq 0,0001$) para la severidad e incidencia al TYLCV-Mld [RE]. No se observaron diferencias al interior de los grupos de las

líneas y testigos susceptibles (tabla 27). Los resultados fueron similares en los dos experimentos realizados en años consecutivos.

Las líneas obtenidas y TY172 se mantuvieron asintomáticas; sin embargo, los cultivos susceptibles mostraron síntomas severos de la enfermedad (tabla 27).

Tabla 27. Severidad e incidencia del TYLCV-Mld [RE] por genotipo a los 56 días después de la inoculación mediante injerto y vector.

Genotipo	Injerto		Vector	
	Severidad*	Incidencia	Severidad*	Incidencia
LD3	1 b	0 b	1 b	0 b
LD4	1 b	0 b	1 b	0 b
LD5	1 b	0 b	1 b	0 b
LD6	1 b	0 b	1 b	0 b
TY172	1 b	0 b	1 b	0 b
Farmer	7,28 a	100 a	6,80 a	100 a
13-8-2	7,12 a	100 a	7,00 a	100 a
R-13	6,35 a	100 a	6,81 a	90 a

*Escala (1-9) Delatte (2005) a y b: significativo según la prueba Student-Newman-Keuls $P \leq 0.0001$

En la figura 18 se muestra la línea LD5 (Vyta) y el testigo susceptible Farmer, a los 56 ddi mediante vector.



Figura 18. Severidad del TYLCV-Mld [RE] a los 56 ddi mediante vector. Al fondo de la figura se muestran plantas de la línea LD5 (Vyta), asintomáticas. Delante, el testigo susceptible Farmer con síntomas severos de la enfermedad.

El TYLCV-Mld [RE] fue observado por primera vez en la isla Reunión en 1997, al causar pérdidas de hasta el 80% en variedades susceptibles sembradas a campo abierto (Peterschmitt y *col.*, 1999).

El interés por evaluar las cuatro líneas cubanas ante el TYLCV-Mld [RE], estuvo basado en lo informado por Pico y *col.*, (1998) y Sánchez Campos y *col.*, (1999), acerca de que algunas de las fuentes de resistencia identificadas en un lugar dado, podían no ser útiles en otros donde existen diferentes condiciones epidemiológicas.

Czosnek y Laterrot (1997) plantearon que una línea tolerante o resistente a un aislado particular del TYLCV podría resultar no efectiva frente a otro aislado distante del mismo.

La secuencia del TYLCV de la isla Reunión es sólo 93% similar a las secuencias del TYLCV de República Dominicana, Cuba e Israel (Delatte, 2005).

Rampersard y Umaharan (2003) plantearon que en *S. chilense* LA1969, el gen *Ty-1*, acompañado de dos genes modificadores, confieren un buen nivel de resistencia al TYLCV; pero parecen ser igualmente eficaces frente a otros begomovirus bipartitos (Picó y col., 1998; Picó y col., 2000; Hanson y col., 2000); lo que pudiera explicar el comportamiento exhibido por los genotipos.

En España, el Virus del encrespamiento de las hojas del tomate de Serdeña [*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV)] presentaba una alta estabilidad genética desde inicios de los años noventa. Sin embargo, la migración de nuevos tipos genéticos de begomovirus dio lugar a una rápida alteración de la diversidad y estructura de la población viral existente. Así, la introducción del TYLCV-IL y TYLCV-Mld resultó en un desplazamiento progresivo del TYLCSV en las epidemias (Morilla y col., 2004; Moriones y Navas-Castillo, 2008).

En Israel, han sido informados el TYLCV-IL y el TYLCV-Mld (Navot y col., 1991; Antignus y Cohen, 1994). Este último fue reconocido por su capacidad de inducir síntomas más suaves en el cultivar TY20, resistente al TYLCV-IL. Harrison y Robinson, (1999) y Navas-Castillo y col., (2000), coinciden en la capacidad de recombinación que posee el TYLCV-Mld (informada con un ancestro del ToLCV de la India), lo que asevera el relevante potencial de los begomovirus para generar diversidad genética a través de la recombinación (Maruthi y col., 2003; Moriones y Navas-Castillo, 2008) y debe ser tenido en cuenta entre las fuerzas evolutivas en este grupo de virus.

Resende y col., (2004) sostienen que la diversidad de begomovirus presente en el tomate indica la necesidad de contar con fuentes de resistencia de amplio espectro;

mientras que Picó y col., (1998) y Hanson y col., (2000) sostienen que la pirimidación de genes que controlan diferentes mecanismos de resistencia al TYLCV puede ser una estrategia para incrementar la durabilidad y estabilidad de las resistencias a begomovirus, lo cual constituye el principal objetivo de la mejora hoy día.

3.5.3.2.3. Presencia del ADN viral del TYLCV-Mld [RE]

En la tabla 28 se muestra la comprobación del ADN viral del TYLCV-Mld [RE] mediante la técnica TAS-ELISA. En los dos ensayos realizados, se determinó la presencia del ADN viral del TYLCV-Mld [RE] en el 100% de las plantas de los genotipos evaluados, después de inoculación por injerto.

Tabla 28. Comprobación del ADN viral del TYLCV-Mld [RE] mediante TAS-ELISA, en los dos ensayos realizados, a los 56 ddi mediante injerto y vector.

Genotipo	Ensayo I				Ensayo II			
	Injerto		Vector		Injerto		Vector	
	n+*	Total	n+	Total	n+	Total	n+	Total
LD 3	10	10	7	9	10	10	9	10
LD 4	9	9	8	10	10	10	9	10
LD 5	9	9	10	10	10	10	10	10
LD 6	10	10	10	10	9	9	9	10
TY172	8	8	8	10	10	10	9	10
Farmer	10	10	10	10	9	9	10	10
13-8-2	10	10	10	10	9	9	10	10
R-13	10	10	10	10	10	10	10	10

*n+: Número de plantas positivas; Total: total de plantas evaluadas

Después de la inoculación por vector, en el ensayo I, se detectó la presencia viral en el 100% de las plantas de las líneas LD5 y LD6; en el 80% de las plantas de LD4 y TY172 y en el 77,7% de las plantas de LD3. En el ensayo II, se detectó la presencia viral en el 100% de las plantas de la línea LD5; y en el 90% de las plantas de las

líneas LD3, LD4, LD6 y TY172. En los genotipos susceptibles se detectó el ADN viral en el 100% de las plantas, en los dos ensayos realizados (tabla 28).

Los resultados obtenidos muestran la necesidad de cuantificar el ADN viral para establecer definitivamente el concepto de resistencia al TYLCV-Mld [RE] en los genotipos evaluados según lo establecido por Lapidot y Friedmann (2002).

4. RESULTADOS PRINCIPALES

1. Se obtuvieron cuatro líneas de tomate (LD3, LD4, LD5 y LD6) resistentes al TYLCV-IL [CU].
2. Se propuso y validó una metodología de evaluación de fuentes genéticas de tomate para la resistencia al TYLCV-IL [CU] en las condiciones de Cuba.
3. Se comprobó la introgresión del gen *Ty-1* de *S. chilense* LA1969, en las líneas LD3, LD4 y LD5, a través de la genotipificación molecular con marcadores del tipo RFLP.
4. La línea LD5 se liberó como variedad comercial con el nombre de Vyta.
5. Las líneas LD3, LD4, LD5 y LD6, se mostraron asintomáticas en condiciones de infección natural frente al TYLCV-Mld, de isla Reunión, situada en el océano Índico.

5. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo permiten concluir que:

1. El proceso de selección desarrollado en este trabajo permitió obtener líneas S9 portadoras de al menos dos fuentes de resistencia al TYLCV-IL [CU].
2. La resistencia genética al TYLCV-IL [CU] en el tomate en nuestras condiciones debe ser descrita por: la supresión del desarrollo de los síntomas de la enfermedad (grado 0 de la escala de Scott y Schuster, 1991); la reducción de la multiplicación viral (concentración de ADN viral $\leq 1\text{ng}/\mu\text{l}$) y la ausencia de afectación significativa del rendimiento productivo (Kg/pl).
3. El marcador TG97, ligado al gen *Ty-1* de *S. chilense* LA1969, es efectivo para el monitoreo de la introgresión del gen en las condiciones del presente estudio. El marcador TG 297 no presentó polimorfismo.
4. La genotipificación molecular con el marcador TG97, ligado al gen *Ty-1*, permitió diferenciar la presencia de al menos dos fuentes de resistencia al TYLCV-IL[CU] presentes en las líneas S9 obtenidas; una que se controla por el gen *Ty-1* de *S. chilense* (LD3, LD4 y LD5) y otra nueva fuente de resistencia de origen desconocido (LD6).
5. La fuente de resistencia al TYLCV-IL [CU], LD5 (Vyta), proveniente de *S. chilense* LA1969, puede mostrar estabilidad e independencia de la aplicación de plaguicidas químicos.

6. RECOMENDACIONES

1. Utilizar las líneas LD3, LD4 y LD5, portadoras del gen *Ty-1*, como fuentes de resistencia al TYLCV-IL [CU] en programas de mejoramiento del tomate.
2. Estudiar la línea LD6 mediante métodos moleculares para la genotipificación de otros genes de resistencia al TYLCV (*Ty-2* y *Ty-3*) que pudieran estar presentes en la misma.
3. Estudiar genéticamente las líneas obtenidas (LD3, LD4, LD5 y LD6) para su recomendación como progenitores en programas de obtención de híbridos F₁ y de modificación genética por transformación.
4. Emplear la metodología de evaluación de fuentes genéticas de tomate para la resistencia al TYLCV-IL [CU] propuesta en el presente trabajo, en programas de mejora y estudio de germoplasma en Cuba.
5. Estudiar la estabilidad del rendimiento de las líneas LD3, LD4 y LD6 en diferentes localidades del país y continuar la generalización de la variedad Vyta.
7. Introducir los resultados de esta tesis en los programas de docencia pre y postgraduada.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Aastveit, H. y H. Martens** (1986) ANOVA interactions interpreted by partial least squares regression. *Biometrics* **42** 829-844.
2. **Agrama, H.A. y J. W. Scott** (2006) Quantitative trait loci for Tomato yellow leaf curl virus and Tomato mottle virus resistance in tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **131** 267-272.
3. **Ahmed, E.A** (2000) A breeding strategy for construction multiresistant genotypes of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) adapted for cultivation in the tropics. Thesis submitted Doctor of Philosophy in Plant Breeding. Fac. Agricultural Sciences. University of Gezira, Sudan. 224 p.
4. **Álvarez, M.** (1987) Mejoramiento genético del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) para siembras de primavera. Tesis de grado. INCA. 125 p.
5. **Álvarez, M., G. de Armas y B. Martínez** (1997) Amalia y Mariela, dos nuevas variedades de tomate para consumo fresco. *Cultivos Tropicales* **18** (1):82.
6. **Álvarez, M., C. Moya, M. Florido y D. Plana** (2003) Resultados de la mejora genética del tomate y su incidencia en la producción hortícola de Cuba. *Cultivos Tropicales* **24** (2):63-70.
7. **Anaïs, G.** (2001) La tomate. En : L'amélioration des plantes tropicales. A. Charrier, M. Jacquot, S. Hamon y D. Nicolas (eds.). Tropical Plant Breeding. CIRAD and Science Publishers, 5241-553.
8. **Angosto, T.** (2005) Mejora genética del sabor en el tomate: identificación de marcadores moleculares para la selección de genotipos de interés agronómico. Disponible en: <http://www.fiapa.es>.

9. **Antignus, Y. y S. Cohen** (1994) Complete nucleotide sequence of an infectious clone of a mild isolate of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Phytopatology* **84** 707-712.
10. **Ascencio-Ibáñez, J.T., R. Díaz-Plaza, J. Méndez-Lozano, Z.I. Monsalve-Fonnegra, G.R. Arguello-Astorga, R.F. Rivera-Bustamante** (1999) First report of Tomato yellow leaf curl geminivirus in Yucatán, México. *Plant Dis.* **83** 1178.
11. **Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC)** (2002) Annual Report 2001. Shinhua, Taiwan. p 12-13.
12. **Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC)** (2004) Annual Report 2003. Publication number 04-599. Shinhua, Taiwan. 194 p.
13. **Bellow, T.S., T.M. Perring, R.J. Gell y D.M. Meadrick** (1994) Description of a species of *Bemisia* (Homóptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87** (2):195-206.
14. **Bernal, A** (2007) Caracterización de aislamientos de *Cladosporium fulvum* (Cooke) provenientes de cultivos protegidos. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Univ. Central “Marta Abreu” de Las Villas. 76 p.
15. **Bird, J., A.M. Idris, D. Rogan y J.K. Brown** (2001) Introduction of the exotic Tomato yellow leaf curl virus-Israel in tomato to Puerto Rico. *Plant Dis.* **85** 1028.

16. **Brown, J. K.** (1994) Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agroecosystems worldwide. *FAO Plant Protection Bulletin* **42** (1-2): 3-32.
17. **Caciagli, P., D. Bosco y L. Al-Bitar** (2000) Relationships of the Sardinian isolate of Tomato yellow leaf curl geminivirus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*. *Gen. Eur. J. Plant. Pathol.* **101** 163-170.
18. **Candelas, M., G. Alanís, M. G. Bautista, M. del Río, y C. García** (2005) Contenido de licopeno en jugo de tomate secado por aspersión. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* **4** 299-307.
19. **Cardoza, H., A. Casanova, T. Depestre, O. Gómez, J.C. Hernández y A. Hernández** (2000) Situación actual de la producción de tomate y pimiento. Proyección y demandas tecnológicas. IIHLD Informe y presentación al Polo Científico del Oeste. La Habana, Noviembre 2000.
20. **Cardoza, H.** (2007) Informe final proyecto 0618 Estudio de la cadena productiva del tomate consumo fresco. IIHLD, La Habana. 32 p.
21. **Carravedo, M** (2006) Variedades autóctonas de Aragón. CITA (eds.), Aragón. 238 p.
22. **Caruana, M** (2007) Coordinator report. Final Report BETOCARIB ICA4-2001-10002. Disponible en: <http://betocarib.cirad.fr>.
23. **Casanova, A., O. Gómez, F.R. Pupo, M. Hernández, M. Chailloux, T. Depestre, J.C. Hernández [y col.]** (2007) Manual para la Producción Protegida de Hortalizas. 2ª Edición. MINAGRI-IIHLD (eds.). ISBN. 959 7111 37 3. 138 pp.

24. **Causse, M.** (2007) Génétique et amelioration des fruits et legumes. Disponible en : [www.inracompact.avignon](http://www.inracompact.avignon.fr). France.
25. **Cebolla-Cornejo, J., S. Roselló, J. Beltrán, E. Serrano y F. Nuez** (2005) Análisis de perfiles aromáticos en variedades tradicionales y comerciales de tomate. *Agric. Food. Chem.* **35** 540-544.
26. **Cohen, S. y I. Harpaz.** (1964). Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomol. Exp. Appl.* **7** 155-166.
27. **Cohen, S. y F.E. Nitzany** (1966) Transmisión and host range of the Tomato yellow leaf curl virus. *Phytopatology* **56** 1127-1131.
28. **Cohen, S. y Y. Antignus** (1994) Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Adv. Dis. Vector Res.* **10** 259-288.
29. **Cooper, J.I. y A.T. Jones** (1983) Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology* **73** 127-128.
30. **Cornide, M.T., O. Coto, D. Calvo, E. Canales, F. de Prada Esquivel y G. Pérez Oramas** (2000) Molecular markers for the identification and assisted management of genetic resources for sugarcane breeding. *Plant Varieties and Seeds* **13** 113-123.
31. **CUBA, MINAGRI** (1984) Instructivo técnico del cultivo del tomate. Dirección Nacional de Cultivos Varios (eds.). La Habana.
32. **Cuba, MINAGRI** (2002) Programa de defensa fitosanitaria para casas de cultivo protegido: tomate, pimiento, melón y pepino. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (eds.). La Habana. 52 p.

33. **Cuba, MINAGRI** (2008) Estadísticas producción anual de semillas. Grupo Empresarial Cultivos Varios MINAG, La Habana.
34. **Czosnek, H., R. Ber, Y. Antignus, S. Cohen, N. Navot y D. Zamir** (1988) Isolation of Tomato yellow leaf curl virus, a geminivirus. *Phytopathology* **78** 508-512.
35. **Czosnek, H. y H. Laterrot** (1997) A worldwide survey of Tomato yellow leaf curl viruses. *Archives Virol.* **142** 1391-1406.
36. **Darwin, S.C., S. Knapp y I.E. Peralta** (2003) Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Systematics and Biodiversity* **1** 29–54.
37. **Delatte, H., B. Reynaud, J.M. Lett, M. Peterschmitt, M. Granier, J. Ravololonandrianina y R. Goldbach** (2003) First molecular identification of a begomovirus isolated from tomato in Madagascar. *Plant Disease* **86** 1404.
38. **Delatte, H.** (2005) Study of the pathosystem: Begomovirus/*Bemisia tabaci*/tomato on the South West islands of the Indian Ocean. Ph.D Thesis. Wageningen University, the Netherlands. 160 p.
39. **Dellaporta, S.L., J. Word y J.B. Hicks** (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **1.4** 19-21.
40. **Denis, J.B.** (1988) Two-way analysis using covariates. *Statistics* **19**:123-132.
41. **Depestre, T., O. Gómez, A. Palloix y Y. Rodríguez** (2004) Construcción de multirresistencia a enfermedades virales y adaptación al trópico en genotipos de pimiento (*Capsicum annuum* L) y su aplicación. Premio Anual ACC. La Habana.

42. **Easdown, W., y T. Kalb** (2004) Antioxidant capacities and daily antioxidant intake from vegetables consumed in Taiwan. AVRDC Progress Report. Shanhua, Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center.
43. **Eberhart, S.A. y W.A. Russell** (1966) Stability parameters for comparing varieties. *Crop. Sci.* **6** 36-40.
44. **FAOSTAT data** (2006) Datos 2005 de producción. Disponible en : faostat.fao.org/faostat.
45. **Fargette, D., M. Leslie y B.D. Harrison** (1996) Serological studies on the accumulation and localisation of three tomato leaf curl geminiviruses in resistant and susceptible *Lycopersicon* species and tomato cultivars. *Ann. Appl. Biol.* **128** 317-328.
46. **Fauquet, C.M., D.P. Maxwell, B. Gronenborn y J. Stanley** (2000) Revised proposal for naming geminiviruses. *Archives of Virology* **145** 1743-1761.
47. **Fauquet, C.M., D.M. Bisaro, R.W. Briddon, J.K. Brown, B.D. Harrison, E.P. Rybicki, D.C. Stenger y J. Stanley** (2003) Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Arch. Virol.* **14** 405-421.
48. **Fauquet, C.M., S. Sawyer, A.M. Idris y J.K. Brown** (2005) Sequence analysis and classification of apparent recombinant begomoviruses infecting tomato in the Nile and Mediterranean Basins. *Phytopathology* **95** 549-555.
49. **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.* DOI 10.1007/s00705-008-0037-6. Springer Verlag 2008.

50. **Finlay, K.W. y G.N. Wilkinson** (1963) The analysis of adaptation in a plant-breeding programme. *Aust. J. Agric. Res.* **14** 742-754.
51. **Florido, M.** (2007). Evaluación de la tolerancia al calor en muestra de germoplasma de tomate (*Solanum* L. sección *Lycopersicon* subsección *Lycopersicon*) conservado *ex situ* en Cuba. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA, La Habana. 101 p.
52. **Friedmann J.M., M. Lapidot, S. Cohen y M. Pilowsky** (1998) A novel source of resistance to Tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *J. Amer.Soc.Hort.Sci.* **123** 1004-1007.
53. **Frohlich, D.R., I. Torres-Jerez, I.D. Bedford, P.G. Markham y J.K. Brown** (1999) A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* **8** 1683-1691.
54. **Fuentes, A.D.** (2008) Plantas transgénicas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) inmunes al virus causante del encrespamiento y amarillamiento de la hoja (TYLCV) mediante la producción de ARNi específico del gen *c1* asociado a la replicación viral. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. CIGB, La Habana. 126 p.
55. **Gálvez, G. y A. Sigarroa** (2006) Curso de Estadística y Diseño Experimental. Facultad de Biología. Departamento de Biología Vegetal (eds.). Universidad de La Habana. 84 p.
56. **Gauch, H.G.** (1988) Model selection and validation for yield trials with interaction. *Biometrics* **44** 705-715.

57. **Gauch, H.G y R.W. Zobel** (1996) AMMI analysis of yield trials. En: M.S. Kang y H.G. Gauch (eds.) Genotype-by-environment interaction. p 85-122. Boca Ratón, FL. CRC Press.
58. **Geneif, A.A.** (1984) Breeding for resistance to Tomato yellow leaf curl virus in tomatoes in Sudan. *Acta Hortic.* **143** 469-484.
59. **Gennadius, P.** (1889) Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. *Ellenike Georgia* **5** 1-13.
60. **Georgiev, H** (1991) Heterosis in tomato breeding. En: Kalloo G. (eds). Genetic improvement of tomato, p 83-98. Springer-Verlag, Berlin
61. **Ghanim, M. y H. Czosnek** (2000) Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-I) is transmitted among whiteflyies (*Bemisia tabaci*) in a sex related manner. *Journal of Virolog.* **74** 4738-4745.
62. **Giordano, L.B., L.S. Boiteux y J.B. Silva** (2005) Selection of heat tolerant imbred lines from landraces adapted for cultivation in the north region of Brazil. *Hortic. Bras.* **23** (1):105-107.
63. **Gómez, O., A. Casanova, H. Laterrot y G. Anaïs** (2000) Mejora genética y manejo del cultivo del tomate para la producción en el Caribe. IIHLD (eds.) 152 p.
64. **Gómez, O., M. Piñón, Y. Martínez, M. Quiñones, D. Fonseca y H. Laterrot** (2004) Breeding for resistance to Begomovirus in tropic adapted tomato genotypes. *Plant Breeding* **123** (1):271-275.
65. **Gómez, O** (2007) Individual partner report. Final Report BETOCARIB ICA4-2001-10002: 76-85. Disponible en: <http://betocarib.cirad.fr>.

66. **González, G. y S. Valdés** (1995) Virus del encrespamiento amarillo de las hojas del tomate (TYLCV) en Cuba. *CEIBA* **36** (1):103.
67. **González, T., E. Monteverde, C. Marín y P.M. Madriz** (2007) Comparación de tres métodos para estimar la estabilidad del rendimiento en nueve variedades de algodón. Disponible en: http://www.interciencia.org/v32_05/344.pdf.
68. **Hanson, P.M., D. Bernacchi, S. Green, S.D. Tanksley, V. Muniyappa, A.S. Padmaja, H.M. Chen, G. Kuo, D. Fang y J.T. Chen** (2000) Mapping a wild tomato introgression associated with Tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **125** 15-20.
69. **Hanson, P.M., S.K. Green y G. Kuo** (2006) *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Rept. Tomato Genetics Coop.* **56**.
70. **Harrison, B. y D. Robinson** (1999) Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopathol.* **37** 369-398.
71. **Hazera** (2004) Catálogo de semillas de hortalizas. Hazera Quality Seeds (eds.). Brurim. D.N. Shikmim 79837. Israel.
72. **Hernández, A., [y col.]** (1999) Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana. MINAGRI. 107 p.
73. **Hilje, L.** (2003) Estatus del manejo de *Bemisia tabaci* en América Latina y el Caribe: ocho preguntas pertinentes. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, Costa Rica **70** 78-89.

74. **Hilje, L.** (2004) Avances hacia el manejo sostenible del complejo *Bemisia tabaci*-geminivirus en tomate, en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas* **61** 70-81.
75. **Hoisington, D.** (1992) Laboratory protocols. Appl. Molecular Genetics Laboratory CIMMYT. México, D. F.
76. **Holt, J. y T. Chancellor** (2007) Individual partner report. Final Report BETOCARIB ICA4-2001-10002. Disponible en: <http://www.betocarib.cirad.fr>.
77. **Huerres, C.** (2002) Informe de Producción Campaña 2001-2002. ECV Manacas, Villa Clara.
78. **Ingram, D.M. y A. Henn** (2001) First report of Tomato yellow leaf curl virus in Mississippi. *Plant Dis.* **85** 1287.
79. **Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-Avignon)** (1997) Unité de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint Maurice, Montfavet, France.
80. **Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-Avignon)** (1999) Unité de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint Maurice, Montfavet, France.
81. **Jenkins, J.A.** (1948) The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany* **2** 379-392.
82. **Ji, Y. y J.W. Scott** (2005a) Identification of RAPD markers linked to *Lycopersicon chilense* derived begomovirus resistant genes on chromosome 6 of tomato. *Acta Horticulturae* **695** 407-416.

83. **Ji, Y., y J.W. Scott** (2005b) Development of SCAR and CAPS markers linked to tomato begomovirus resistance genes introgressed from *Lycopersicon chilense*. *HortSci.* **40** 1090.
84. **Ji, Y., y J.W. Scott** (2006) Development of breeder friendly markers for begomovirus resistance genes derived from *S. chilense*. Proc Tomato Breeders Roundtable, Tampa, FL, USA. roundtable06.ifas.ufl.edu/schedule.htm.
85. **Ji, Y., D.J. Schuster y J.W. Scott** (2007) *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding* **20** (3): 271.
86. **Kaloo, G., y M.K. Banerjee** (1990) Transfer of Tomato leaf curl virus resistance from *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *L. esculentum*. *Plant Breeding* **105** 156-159.
87. **Kasrawi, M.A., M.A. Suwwan y A. Mansour** (1988) Sources of resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in *Lycopersicon* species. *Euphytica* **37** 61-64.
88. **Kasrawi, M.A.** (1989) Inheritance of resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Plant Disease* **73** 435-437.
89. **Kon, T., S.H. Hidayat, S. Hase, H. Takahashi y M. Ikegami** (2006) The natural occurrence of two distinct begomoviruses associated with DNA β and a recombinant DNA in a tomato plant from Indonesia. *Phytopathology* **96** 517-525.
90. **Kumar, P.** (2005) Management of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato using biorational pesticides and UV-

- absorbing nets and films as greenhouse cover in the humid tropics. PhD Thesis Hannover University. 138 p.
91. **Lapidot, M., M. Friedmann, M. Lachman, O. Yehezkel, A. 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.
 92. **Lapidot, M., M. Friedmann, M. Pilowky, 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. *Phytopathology* **91** (12):1209-1213.
 93. **Lapidot, M. y M. Friedmann** (2002) Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology* **140** 109-127.
 94. **Lapidot, M. y J.E. Polston** (2006) Resistance to Tomato yellow leaf curl virus in tomato. En: Natural Resistance Mechanism of Plant Viruses. G. Loebeinstein y J. P. Carr (eds). Netherlands. Chapter B9. 503-520.
 95. **Lapidot, M., R. Ben-Joseph, L. Cohen, Z. Machbash y M. Pilowsky** (2006) Development of a scale for evaluation of Tomato yellow leaf curl virus resistance level in tomato plants. *Phytopathology* **96** 1404-1408.
 96. **Laterrot, H.** (1989) La tomate. Interet et utilisation des espèces sauvages pour la création variétale. *PHM Revue Horticole* **295**.
 97. **Laterrot, H. y A. Moretti** (1994) The Chillylic populations of the EEC-DGX programme. *Tomato Leaf Curl Newsletter* **5** 2.

98. **Latterot, H.** (2002) Breeding strategies for disease resistance in tomatoes with emphasis on the tropics: Current status and research challenges. 1st Int. Symp. on Tropical Tomato Disease. Brasil. p 126-132.
99. **LeMing Hong** (1992) Selección de progenitores para el mejoramiento genético del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en siembras fuera de época óptima (Tesis de Doctorado) INCA. 137 p.
100. **Li, T.S.C.** (2008) Nutritional and therapeutic values. Vegetables and Fruits. CRC Press Taylor & Francis Group (eds.). Boca Ratón. EE.UU.
101. **Luckwill, L.C.** (1943) The genus *Lycopersicon*. Aberdeen University Studies **120**.
102. **Martínez, Y.** (1998) Contribución al conocimiento de geminivirus que afectan al cultivo del tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill. en Cuba. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. CENSA, La Habana. 119 p.
103. **Martínez, Y., C. de Blas, M. Quiñones, C. Castellanos, E.L. Peralta y J. Romero** (1998) Havana tomato virus, a new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Cuba. *Arch Virol.* **143** 1757-1772.
104. **Martínez, Y., M. Quiñones y D. Fonseca** (2003) National survey of tomato begomovirus in Cuba. *Protección de Plantas* **18** (3):168-175.
105. **Martínez, Y., M. Quiñones, I. Palenzuela y Y. Muñiz** (2006) Diversidad de begomovirus presentes en Cuba. *Protección de Plantas* **21** (3):149-154.
106. **Martínez, Y** (2007) Individual partner report. Final Report BETOCARIB ICA4-2001-10002: 56-75. Disponible en: <http://betocarib.cirad.fr>.

107. **Maruthi, M.N., H. Czosnek, F. Vidavski, H.Y. Tarba, J. Milo, S. Leviatov, H.M. Venkatesh, A.S. Padmaja, R.S. Kukarni, y V. Muniyappa** (2003) Comparison of resistance to Tomato leaf curl virus (India) and Tomato yellow leaf curl virus (Israel) among *Lycopersicon* wild species, breeding lines and hybrids. *Europ. J. Plant Pathol.* **109** 1-11.
108. **Maxwell, D.P., C. Martin, M. Salus, L. Montes y L. Mejía** (2006). Tagging begomovirus resistance genes. Disponible en: www.plantpath.wisc.edu/geminivirusresistanttomatoes/markers.
109. **McAuslane, H.J** (2007) *Bemisia tabaci*. University of Florida, EENY-129.
110. **McGlashan, D., J.E. Polston y D. Bois** (1994) Tomato yellow leaf curl geminivirus in Jamaica. *Plant Dis.* **78** 1219.
111. **Mejía, L., R.E. Teni, F. Vidavski, H. Czosnek, M. Lapidot, M.K. Nakhla y D. P. Maxwell** (2005) Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for resistance to begomoviruses in Guatemala. *Acta Hort.* **695** 251-255.
112. **Michelson, I., D. Zamir y H. Czosnek** (1994) Accumulation and translocation of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gen *Ty-1*. *Phytopathology* **84** 928-933.
113. **Moore, J.F.** (1971) Campbell 28: an early processing type tomato. Campbell Inst. for Agric. Research. Camden, New Jersey. USA. Leaflet No 2. 7 p.
114. **Morales, F.** (2001). Conventional breeding for resistance to *Bemisia tabaci*-transmitted geminiviruses. *Crop. Prot.* **20** 825-834.

115. **Morales, F. y P. Anderson** (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.* **146** 415-441.
116. **Morales, F., G. González, C. Murguido, A. Echemendía, Y. Martínez, Y. Hernández, B. Faure y M. Chailloux** (2005) En: Whitefly and whitefly-borne viruses in the tropics: building a knowledge base. Anderson, P. y F. Morales (eds.), p 230-236. CIAT Publ. No. 341, Palmira, Colombia.
117. **Morales, F.** (2006) History and current distribution of begomoviruses in Latin America. En: Advances in virus research, Vol. 67. CIAT, Publ. No. 341, p 127-162. Palmira, Colombia.
118. **Morales, F., C. Cardona, J.M. Bueno, I. Rodríguez** (2006) Manejo integrado de enfermedades de plantas causadas por virus transmitidos por moscas blancas. CIAT. Cali, Colombia. 43p.
119. **Morilla, G., B. Krenz, H. Jeske, E.R. Bejaranon y C. Wege** (2004) Tete a Tete of Tomato yellow leaf curl virus and Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in single nuclei. *Journal of Virology* **78** 10715-10723.
120. **Moriones, E. y J. Navas Castillo** (2008) Review. Rapid evolution of the population of begomoviruses associated with the Tomato yellow leaf curl disease after invasion of a new ecological niche. *Spanish Journal of Agricultural Research* **6** (Special Issue), 147-159. ISSN.1695-971-X.
121. **Morrison, D.** (1967). Multivariate statistical methods. Mc Graw-Hill Book Co. (eds.) New York USA. 150 p.

122. **Mound, L. A.** (1963) Host correlated variation in *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: *Aleyrodidae*). En: proceedings of the Royal Entomological Society of London (A). **38** 171-180.
123. **Moya, C., A. Marrero, R. Castro, N. Fraga, D. Echevarría y Z. Fuentes** (1991) Evaluación de variedades de tomate en condiciones de cultivo hidropónico. *Agricultura Tropical* **1** (1):24-45.
124. **Moya, C., M. Álvarez, M. Florido y D. Plana** (2003) Caracterización morfoagronómica de una colección de variedades, líneas e híbridos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) en condiciones de organopónicos. *Cultivos Tropicales* **24** (3):51-58.
125. **Mukandama, J.P.** (2005) Empleo de rayos gamma ^{60}Co para la obtención de genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) con alto potencial productivo en condiciones de bajos suministros de agua (Tesis de grado). INCA. 86 p.
126. **Müller, C.H.** (1940) A revision of the genus *Lycopersicon*. *US Dept. of Agriculture Misc. Publication* **382**.
127. **Muñiz, Y., Y. Martínez, M.A. Martínez, D. Fonseca, M. Granier y M. Pitterschmitt** (2006) Caracterización molecular de poblaciones cubanas de *B. tabaci* (GENNADIUS). *Protección de Plantas* **21** (3):163-169.
128. **Murguido, C.A., L.L. Vázquez, A.I. Elizondo, M. Neyra, Y. Velázquez, E. Pupo, S. Reyes, I. Rodríguez y C. Toledo** (2002) Manejo integrado de plagas de insectos en el cultivo del frijol. *Fitosanidad* **6** (3):29-39.

129. **Nakhla, M.K., A. Sorenson, L. Mejía, P. Ramírez, J.P. Karkashian y D.P. Maxwell** (2005) Molecular characterization of tomato-infecting Begomoviruses in Central America and development of DNA-based detection methods. *Acta Hort.* **695** 277-288.
130. **Nápoles, C.** (2006) Valoración de 66 variedades de tomate frente a begomovirus. Evento 35 Aniversario del IIHLD. Liliana Dimitrova (eds.), La Habana. 3-6 diciembre CD-R, ISBN: 959-7111-39-X.
131. **Naranjo, S.E., L.A Cañas y P.C. Ellsworth** (2004). Mortalidad de *Bemisia tabaci* en un sistema de cultivos múltiples. *Horticultura Internacional* **43**, febrero. 2004.
132. **Navas-Castillo, J., S. Sánchez Campo, E. Noris, D. Louro, G.P. Accoto y E. Moriones** (2000) *J. Gen. Virol.* **81** (Pt 11): 2797-2801.
133. **Navot, N., E. Pichersky, M. Zeidan, D. Zamir y H. Czosnek** (1991) Tomato yellow leaf curl virus: A whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* **185** 151-161.
134. **Nuez, F.** 1995. Desarrollo de nuevos cultivares. En: El cultivo del tomate. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. p 625-669.
135. **Ortiz, R., S. Rodríguez, M.T. Cornide, O. Gómez y E. Espino** (2006) Panorama de los recursos genéticos y el mejoramiento de los cultivos. En: Las investigaciones agropecuarias en Cuba cien años después. Capítulo 6. Ed. Científico-Técnica, La Habana. 136-174.
136. **Padidam, M., S. Sawyer y C.M. Fauquet** (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265** (2):218-225.

137. **Palumbo, J.C., A.R. Horowitz y N. Prabhaker** (2001) Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* **20** 739-765.
138. **Pappu, S.S., H.R. Pappu, D.B. Langston, J.T. Flanders, D.G. Riley y J.C. Díaz-Pérez** (2000) Outbreak of Tomato yellow leaf curl virus (Family Geminiviridae) in Georgia. *Plant Dis.* **84** 370.
139. **Peralta, E. L., M. Pedroso y Y. Martínez.** (1999) Diagnóstico de Fitopatógenos. Manual teórico-práctico. EDICENSA (eds.). La Habana. ISBN 959-7125-07-2.
140. **Peralta, I.E. y D.M. Spooner** (2005) GBSSI gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill) Wettst. Subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany* **88** 1888-1902.
141. **Peralta, I.E., S. Knapp y D.M. Spooner** (2006) New species of wild tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany* **30** (2):424-434.
142. **Pérez de Castro, A., M.J. Díez y F. Nuez** (2007a) Inheritance of Tomato yellow leaf curl virus resistance derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV16991. *Plant Disease* **91** 7: 879.
143. **Pérez de Castro, A., M.J. Díez y F. Nuez** (2007b) Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *Eur. J. Plant. Pathol.* **117** 347-356.
144. **Perring, T.M.** (1996) Biological differences of two species of *Bemisia* that contribute to adaptive advantage. En: *Bemisia* 1995: Taxonomy, biology, damage,

- control and management. D. Gerling & R.T. Mayer (eds.). Intercept. United Kingdom. p. 1-16.
145. **Peterschmitt, M., M. Granier, R. Mekdoud, A. Dalmon, O. Gambin, J.F. Vayssieres y B. Reynaud** (1999) First report of Tomato yellow leaf curl virus in Réunion Island. *Plant Disease* **83** 303.
 146. **Peterschmitt, M.** (2007) Individual partner report. Final Report BETOCARIB ICA4-2001-10002: 37-40. Disponible en: <http://betocarib.cirad.fr>.
 147. **Picó, B., M.J. Díez y F. Nuez** (1996) Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II The tomato yellow leaf curl virus- a review. *Scientia Hort.* **67** 151-196.
 148. **Picó, B., M.J. Díez y F. Nuez** (1998) Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. *Euphytica* **101** 259-271.
 149. **Picó, B., A. Sifres, M. Elía, M.J. Díez y F. Nuez** (2000) Searching for new resistance sources to Tomato yellow leaf curl virus within a highly variable wild *Lycopersicon* genetic pool. *Acta Physiologiae Plantarum* **22** 344-350.
 150. **Pilowsky, M. y S. Cohen** (1973) Inheritance of resistance to Tomato yellow leaf curl virus in tomatoes. *Phytopathology* **64** 632-635.
 151. **Pilowsky, M. y S. Cohen** (1990) Tolerance to Tomato yellow leaf curl virus derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Disease* **74** 248-250.
 152. **Pilowsky, M. y S. Cohen** (2000) Screening additional wild tomatoes for resistance to the whitefly-borne Tomato yellow leaf curl virus. *Acta Physiologicae Plantarum* **22** 351-353.

153. **Piñón, M., O. Gómez, y M.T. Cornide** (2005) RFLP analysis of Cuban tomato breeding lines with resistance to Tomato yellow leaf curl virus. *Acta Hort.* **695** 273-276.
154. **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.
155. **Polston, J.E. y P.K. Anderson** (1997) The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* **81** (12):1358-1369.
156. **Polston, J.E., R.J. McGovern y L.G. 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.
157. **Polston, J.E., T.R. Rosebrock, T. Sherwood, T. Creswell y P.J. Shoemaker** (2002) Appearance of Tomato yellow leaf curl virus in North Caroline. *Plant Dis.* **86** 73.
158. **Polston, J.E., M. Lapidot y H. Czosnek** (2004) TYLCV- worldwide distribution, importance and review. Proc. 1st Int. Symp. on Tomato Diseases and 19th Annual Tomato Disease Workshop. 20-24 June, 2004. Orlando, Fla. 131 p.
159. **Quiñones, M.** (2002) Distribución, variabilidad genética y perfeccionamiento del sistema de diagnóstico molecular del Virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. CENSA. La Habana.

160. **Quiñones, M., D. Fonseca y Y. Martínez** (2004) Comparación de métodos de hibridación de ácidos nucleicos para el diagnóstico del Virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba. *Protección Veg.* **19** (1):26-32.
161. **Ramos, P.L., O. Guerra, R. Peral, P. Oramas, R.G. Guevara, y R. Rivera-Bustamante** (1997) Taino tomato motle virus, a new bipartite Geminivirus from Cuba. *Plant Disease* **81** 1095.
162. **Rampersard, S.N. y P. Umaharan** (2003) Identification of resistance to PYMV-TT among accessions of *Lycopersicon* spp. *Plant Disease* **87** (6):686-691.
163. **Resende, R.O., L.S. Boiteux y L.B. Giordano** (2004) Breeding for broad resistance to new tomato-infecting Brazilian bipartite begomoviruses. Proc. 1st Int. Symp. on Tomato Diseases and 19th Annual Tomato Disease Workshop. 20-24 June. Orlando, Fla. 131 p.
164. **Rick, C.M** (1976) Tomato. *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). En: Evolution of crop plants. Simmonds N.W. (eds.) Longman, London and New York, p 268-273.
165. **Rick, C.M.** (1978) The tomato. *Scientific American* **239** 76-78.
166. **Rojas, M.R., R. Salati, J. Jaquez, M. Sánchez y R.L. Gilbertson** (2004) Integrated pest management (IPM) of Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: application of molecular tools to help manage a devastating virus. Proc. 1st Int. Symp. on Tomato Diseases and 19th Annual Tomato Disease Workshop. 20-24 June, 2004. Orlando, Fla. 131 p.

167. **Rojas, M.R., C. Hagen, W.J. Lucas y R.L. Gilbertson** (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43** 361-394.
168. **Rubinstein, G. y H. Czosnek** (1997) Long-term association of Tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *J. Gen. Virol.* **78** (Pt 10):2683-2689.
169. **Salati, R., M.K. 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. *Virology* **92** (5):487-496.
170. **Salmon, F.** (2006) La création de nouvelles variétés: un défi environnemental. En : *Les Cahiers du PRAM*. Le Lamentin, Martinique **6** 23-29.
171. **Salus, M.S. y D.P. Maxwell** (2006) Application of molecular techniques for detection of disease resistance genes in tomato breeding lines for Guatemala. www.plantpath.wisc.edu/InVirLab/docs/Research%20proposal%20for%20Minidy.pdf.
172. **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 epidemics in Spain. *Phytopathology* **89** 1038-1043.
173. **Sato, S., M. Kamiyama, T. Iwata, N. Makita, H. Furukawa y H. Ikeda** (2006) Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set

- of *Lycopersicon esculentum* by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. *Annals of Botany* **97** (5):731-738.
174. **Scott, J.W. y D.J. Schuster** (1991) Screening of accessions for resistance to the Florida tomato geminivirus. *TGC Report* **41**.
 175. **Scott, J.W.** (2001) Geminivirus resistance derived from *Lycopersicum chilense* accessions LA1932, LA1938, and LA2779. Tom. Breeders Round Table www.oardc.ohio-state.edu/tomato/TBRT%202001%20Abstracts.pdf.
 176. **Scott, J.W.** 2006. Breeding for resistance to viral pathogens. En: Genetic Improvement of Solanaceous Crops Vol. 2: Tomato. M. K. Razdan and Antur K. Mattoo (eds.) Science Publishers, Enfield, USA.
 177. **Shagardsky, T.** (2006) Caracterización de la variabilidad del germoplasma de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) conservada *ex situ* en Cuba. Su presencia y distribución *in situ*. Tesis en opción al título de Maestro en Biología Vegetal. Mención Genética Vegetal. Universidad de La Habana. 113 p.
 178. **Sueiro, L., A. Puertas, O. Gómez, C. Guerrero, R. Blaya, D. García, A. de Souza, A. Verdecia y R. Ayra** (2003) Validación de la variedad de tomate 'Vyta' para consumo fresco, con resistencia a geminivirus, en áreas productoras de la provincia Granma, Cuba. *Alimentaria de Tecnología e Higiene de los Alimentos*. **3** (343):51-53.
 179. **Tanksley, S.D., M.W. Ganai, J.P. Prince, M.C. de Vicente, M.W. Bonierbale, P. Broun, T.M. Fulton, J.J. Giovannoni, S. Granadillo, G.B. Martin, R. Messeguer, J.C. Miller, L. Miller, A. H. Paterson, O. Pineda,**

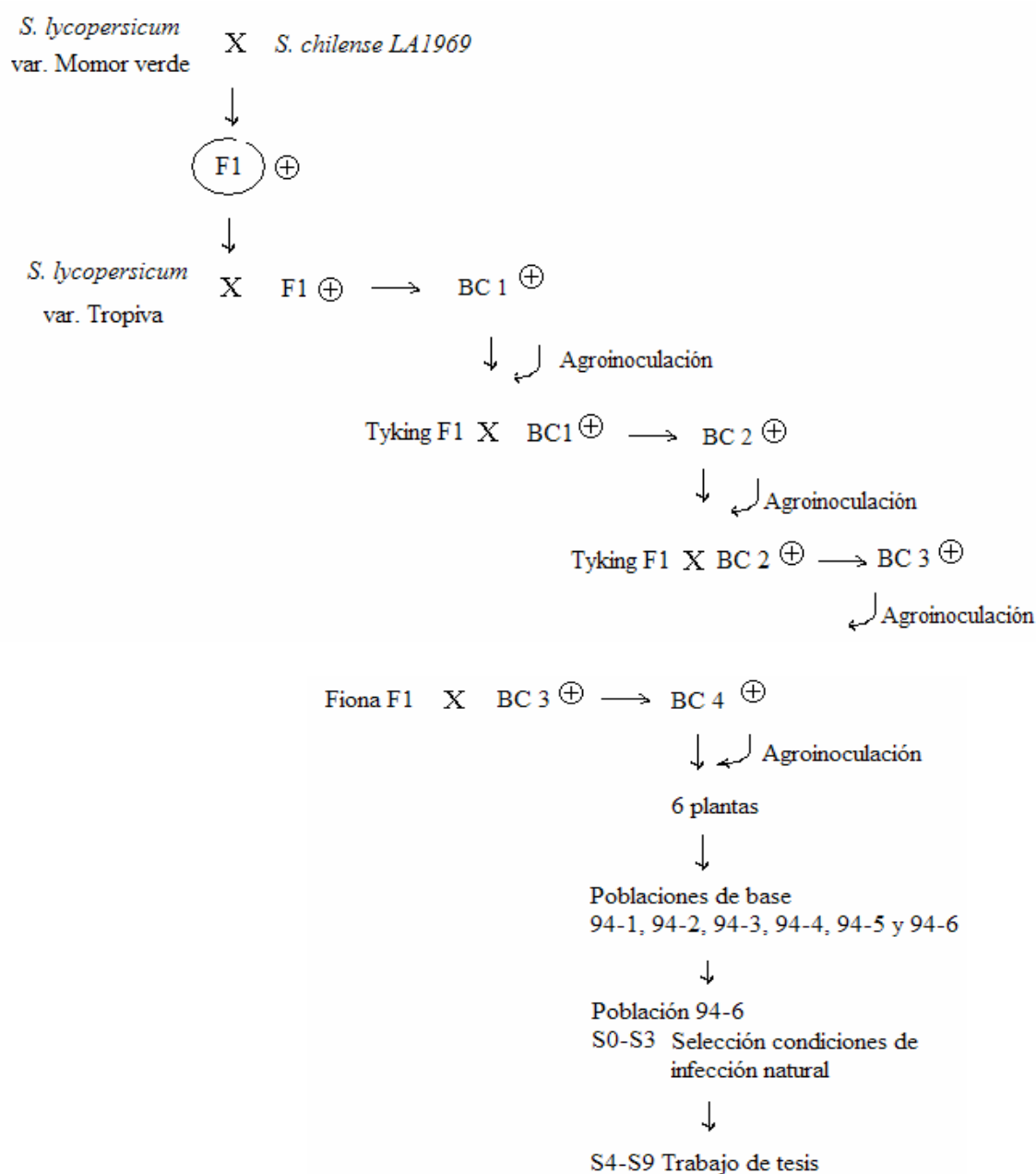
- M.S. Roder, R. A. Wing, W. Wung y N.D. Young** (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132** 1141-1160.
180. **Tzokov, S., A. Ríos y A. Casanova** (1987) Método gráfico-analítico para la determinación de los costos en la producción agrícola. IIHLD-MINAGRI (eds.), La Habana. Abril 1987. 60 p.
181. **Urbino, C. y K. Tassius** (1999) First report of Tomato yellow leaf curl virus in tomato in Guadeloupe. *Plant Dis.* **35** 46-53.
182. **Valverde, R., A.P. Lotrakul, A.D. Landry y J.E. Boudreaux** (2001) First report of Tomato yellow leaf curl virus in Louisiana. *Plant Dis.* **85** 230.
183. **van Regenmortel, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H. Bishop, E. Carstens, M.K. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D. McGeoch, C.R. Pringle y R.B.Wickner** (2000) Virus Taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press (eds). San Diego.
184. **Varela, M. y J.C. Castillo** (2005) Modelos con término multiplicativo. Aplicación en el análisis de la interacción genotipo ambiente. *Cultivos Tropicales* **26** (3):71-75.
185. **Vargas, M., J. Crossa, F.A. van Eeuwijk, M.E. Ramírez y K. Sayre** (1999) Using partial least squares, factorial regression, and AMMI models for interpreting genotype x environment interaction. *Crop Sci.* **39**:955-967.
186. **Varma, A. y V.G. Malathi** (2003) Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* **142** 145-164.

187. **Vázquez, L.L.** (1995) Sistema de diagnóstico, inventario y plantas hospederas de moscas blancas en Cuba. Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana. 121p.
188. **Vázquez, L.L., O. Gómez y A. Mateo** (1995) Informe sobre la problemática mosca blanca-geminivirus en Cuba. Taller Latinoamericano sobre mosca blanca y geminivirus. El Zamorano, Honduras. 16-18 octubre, 1995.
189. **Vázquez, L.L., C. Murguido y G. González** (2006) Manejo integrado del sistema mosca blanca-geminivirus-tomate. Boletín Fitosanitario (La Habana) **11** (1):30-52.
190. **Vidavsky, F., y H. Czosnek** (1998) Tomato breeding lines immune and tolerant to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* **88** 910-914.
191. **Vidavski, F., M. Lapidot y H. Czosnek** (2006) Pile up of resistance genes to TYLVC found in wild species to produce resistant cultivars. Proc. Tomato Breeders Roundtable, Tampa, FL, USA. roundtable06.ifas.ufl.edu/Schedule.htm.
192. **Wagner, J.** (2002) Ingredients to watch in 2002. *Nutritional Outlook* **5** 18–20.
193. **Xue-Yu B., M.R. Thomas, M.S. Rasheed, M. Saeed, P. Hanson, P.J. de Barro y M.A. Rezaian** (2007) A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. *Phytopathology* **97** (8):930-937.

194. **Yan, W.** (1999) Methodology of cultivar evaluation based on yield trial data – with special reference to winter wheat in Ontario. Ph.D. diss. Univ. of Guelph, ON, Canada.
195. **Yan, W.** (2001) GGEbiplot – A Windows application for graphical analysis of multienvironment trial data and other types of two-way data. *Agron. J.* **93** 1111-1118.
196. **Yan, W., L.A. Hunt, Q. Sheng y Z. Szlavnics** (2000) Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. *Crop Sci.* **40** 597-605.
197. **Yates, F. y W.G. Cochran** (1938) The analysis of groups of experiments. *J. Agric. Sci.* **28** 556-580.
198. **Zakay, Y., N. Navot, M. Zeidan, N. Kedar, H. Rabinowitch, H. Czosnek y D. Zamir** (1991) Screening of *Lycopersicon* accessions for resistance to Tomato yellow leaf curl virus: presence of viral DNA and symptom development. *Plant Dis.* **75** 279-281.
199. **Zamir, D., I. Michelson, Y. Zakay, N. Navot, M. Zeidan, M. Sarfatti, Y. Eshed, E. Harel, E. Pleban, T. van-Oss, N. Kedar, H.D. Rabinowitch y H. Czosnek** (1994) Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theor. Appl. Genet.* **88** 141-146.
200. **Zamir, D.** (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat. Rev. Genet.* **2** 983–989.
201. **Zavala-García, F. y J.D. Eastin** (1992) Simultaneous selection for high yielding and stable crop genotypes. *Agronomy Journal* **83** 161-165.

ANEXO 1. Hibridación interespecífica del tomate con el progenitor silvestre *Solanum chilense* LA1969 (antecedentes de este trabajo, datos no mostrados en el mismo).

Esquema de hibridación interespecífica con el progenitor silvestre *S. chilense* LA1969.



A continuación se describe el esquema mostrado.

Se partió del cruzamiento entre la variedad de tomate 'Momor verde', con marcador para la ausencia de antocianina, y la especie *S. chilense* LA1969 con un alto nivel resistencia al TYLCV en Israel y Cuba (Zakay y col., 1991; Gómez y col., 2000). La técnica de rescate de embriones *in vitro* se utilizó para obtener el híbrido F1 interespecífico.

- El híbrido F1 resultante se retrocruzó con la variedad 'Tropiva', de la especie cultivada *S. lycopersicum*, por su adaptación al calor (Laterrot y Moretti, 1994).
- Se realizaron dos retrocruzas con el híbrido F1 comercial 'Tyking', proveniente de *S. chilense*; y posteriormente se ejecutó una tercera retrocruza con el híbrido F1 comercial 'Fiona'. Ambos cultivares habían mostrado una baja expresión de síntomas del TYLCV al ser probados en Cuba (Gómez y col., 2000). Luego de cada retrocruza se procedió a la agroinoculación del ADN del TYLCV, a fin de detectar las plantas sanas sobre las cuáles avanzó el programa (Laterrot y Moretti, 1994).
- Finalmente, se obtuvieron seis plantas sanas que dieron lugar a las poblaciones de base: 94-1, 94-2, 94-3, 94-4, 94-5 y 94-6. El TYLCV en la población 94-6, a través de las generaciones o ciclos S0 a S3 (datos no contemplados en este trabajo) mostró los valores más bajos de severidad e incidencia, en comparación con las otras cinco poblaciones de base, al ser seleccionadas en condiciones de infección natural, por lo cual se prosiguió la selección a partir de ésta población. El presente trabajo de tesis comenzó en 1998 con la selección individual en la generación S4 de la población 94/6.

ANEXO 2. Variables climáticas que incidieron en el transcurso de los experimentos

Temperatura (°C)

Mes	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04
Febrero	-	-	-	23.3	22.0	-
Marzo	22.6	23.4	22.4	23.0	23.8	24.9
Abril	25.4	24.8	24.1	24.3	25.1	23.5
Mayo	27.1	25.7	26.3	24.8	26.4	26.6
Junio	28.0	27.4	25.6	-	26.6	26.8
Noviembre	24.7	23.9	23.2	-	23.7	24.0
Diciembre	23.3	22.1	21.9	-	22.1	20.8
Enero	23.2	21.4	18.3	-	18.8	-
Febrero	24.7	23.5	23.3	-	19.4	-

Precipitaciones (mm)

Mes	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04
Febrero	-	-	-	11.0	74.8	-
Marzo	140.0	53.2	6.9	9.1	64.5	118.1
Abril	50.4	80.6	85.9	59.7	11.4	82.5
Mayo	250.3	122.5	107.2	267.3	371.1	115.3
Junio	90.7	270.4	133.5	-	405.1	141.9
Noviembre	20.9	59.5	9.9	-	82.5	88.3
Diciembre	10.4	30.0	96.9	-	64.3	52.2
Enero	48.7	37.7	0.2	-	9.2	-
Febrero	45.8	35.8	11.0	-	41.6	-

Humedad relativa (%)

Mes	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04
Febrero	-	-	-	80	81	-
Marzo	76	78	79	77	78	80
Abril	75	75	77	74	73	78
Mayo	77	78	76	80	78	82
Junio	84	81	82	-	84	82
Noviembre	83	82	80	-	84	81
Diciembre	77	82	84	-	83	81
Enero	81	81	79	-	79	79
Febrero	79	79	80	-	82	80

ANEXO 3. Resultados del análisis de varianza de tres factores para la variable rendimiento.

Fuentes de variación	SC	gl	CM	P
Efectos principales				
A: Año	0,242	1	0,242	0,1218
B: Época de siembra	7,17602	1	7,17602	0,0000
C: Genotipo	52,3636	4	13,0909	0,0000
Interacción				
AB	0,000405	1	0,000405	0,9491
AC	0,748837	4	0,187209	0,1209
BC	2,16267	4	0,540667	0,0007
Error	6,29896	64	0,0984212	
Total	68,9925	79		