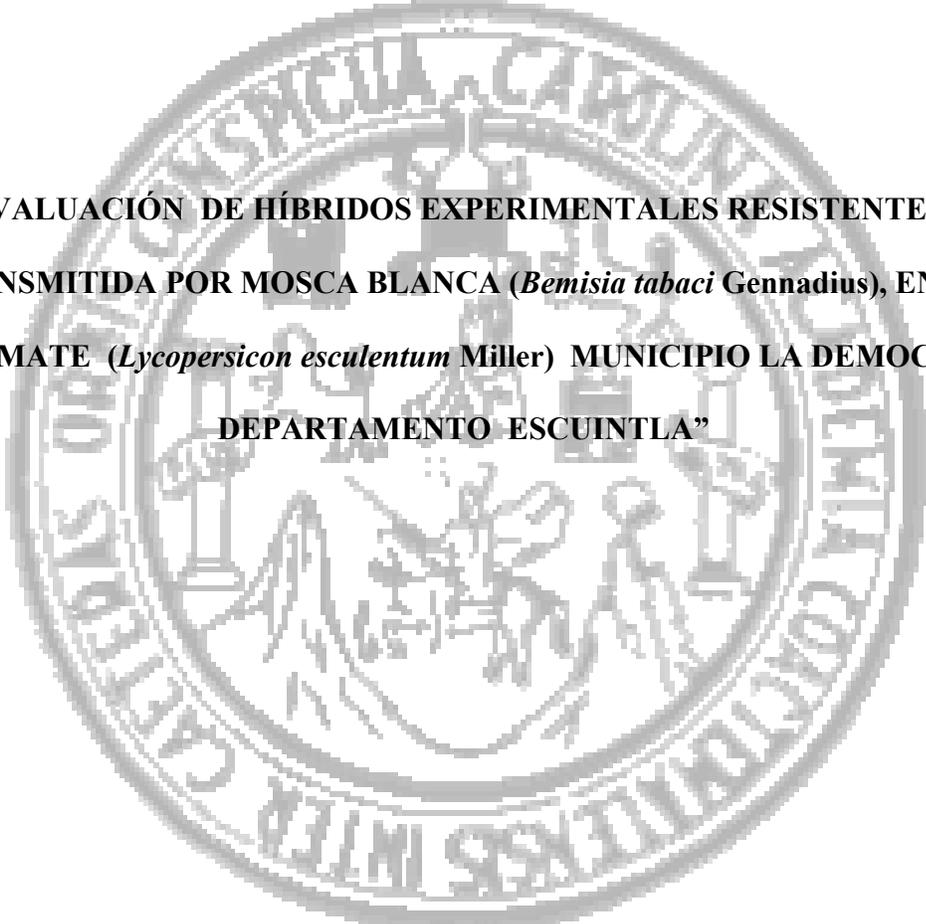


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS



**“EVALUACIÓN DE HÍBRIDOS EXPERIMENTALES RESISTENTES A  
VIROSIS TRANSMITIDA POR MOSCA BLANCA (*Bemisia tabaci* Gennadius), EN EL CULTIVO  
DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Miller) MUNICIPIO LA DEMOCRACIA,  
DEPARTAMENTO ESCUINTLA”**

EDGAR RAFAEL QUINTANA ANDRADE

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2,005



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

**“EVALUACIÓN DE HÍBRIDOS EXPERIMENTALES RESISTENTES A  
VIROSIS TRANSMITIDA POR MOSCA BLANCA (*Bemisia tabaci* Gennadius), EN EL CULTIVO  
DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Miller) MUNICIPIO DE DEMOCRACIA,  
DEPARTAMENTO ESCUINTLA”**

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE  
LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

EDGAR RAFAEL QUINTANA ANDRADE

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2005

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR MAGNÍFICO

MEDICO VETERINARIO LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO:	Dr. Ariel Abderraman Ortiz López
SECRETARIO:	Ing. Agr. Pedro Pelaez Reyes
VOCAL PRIMERO:	Ing. Agr. Alfredo Itzep Manuel
VOCAL SEGUNDO:	Ing. Agr. Walter Arnoldo Reyes Sanabria
VOCAL TERCERO:	Ing. Agr. Erberto Raúl Alfaro Ortíz
VOCAL CUARTO:	M.E.P.U. Elmer Antonio Alvarez Castillo
VOCAL QUINTO:	P.M.P. Mirian Eugenia Espinoza Padilla

Guatemala, Septiembre de 2,005

**Honorable Junta Directiva.**  
**Honorable Tribunal Examinador.**  
**Facultad de Agronomía.**  
**Universidad de San Carlos de Guatemala.**  
**Presente:**

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulado:

**“EVALUACIÓN DE HÍBRIDOS EXPERIMENTALES RESISTENTES A VIROSIS  
TRANSMITIDA POR MOSCA BLANCA (*Bemisia tabaci* Gennadius), EN EL CULTIVO DE  
TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Miller) EN MUNICIPIO LA DEMOCRACIA,  
DEPARTAMENTO ESCUINTLA”.**

Presentado como requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

En espera que la presente investigación llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato presentarles mi agradecimiento.

Atentamente,

EDGAR RAFAEL QUINTANA ANDRADE

## ACTO QUE DEDICO

A

DIOS Divino maestro, esperanza viva, único redentor y fuente de sabiduría; por enseñarme el camino de la vida en todo momento y a valorar las grandezas de este mundo.

MIS PADRES Edgar Arnulfo Quintana Hernández y Alba Eluvia Andrade de Quintana  
A quienes debo mi ser, brindo este triunfo como una recompensa a sus innumerables esfuerzos y sacrificios.

MI ESPOSA Virginia Sobeida Marchorro Florián  
Solidaria e inseparable amiga y compañera, gracias mi cielo por tu apoyo, paciencia, comprensión, amor y por tu lucha incansable a mi lado.

MIS HERMANOS Ruth Alexandra y Carlos José  
Sea un ejemplo de lo que con esfuerzo y dedicación se puede lograr.

MIS ABUELOS José Rodríguez y Ruth Hernández; Alfredo Andrade y Rosario de León.  
(Q.P.D.) Gracias por sus sabios consejos.

MI MADRINA Delfina Rodriguez, Gracias por todo su apoyo incondicional.

MIS TIOS Y TIAS Con respeto y confianza.

MIS PRIMOS Con especial cariño y por la unión familiar que mantenemos.

MIS SUEGROS Lic. Jorge Marchorro y Gloria Florián, por sus muestras de apoyo y cariño.

MIS CUÑADOS Primo, Amancio, Michelle y Amy, con amor fraternal.

MI SOBRINA Silvia Maria, con especial cariño.

MIS AMIGOS: Rafael Humberto, Marco Roberto, Clyde Roberto, Moisés Antonio, Carlos Rodolfo, Mynor, Amilcar, Miguel, Juan Pablo, Marvin Leonardo, Mayra Nij, Jairo Monzón, Fernando Gómez, Juan Pablo, Marlon, Arturo, Eduardo Fong, Fernando Maldonado, Rafael Montero, Ericka, Adela, Lulu, Sarai.

De quienes al pasar el tiempo, tendré el mas grato recuerdo de tiempos inolvidables.

MI FAMILIA

EN GENERAL Como muestra de cariño y respeto.

## TESIS QUE DEDICO

A

MI PAIS GUATEMALA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

CENTRO DE EDUCACION MEDIA AGROPECUARIA DE SUR ORIENTE (CEMAS) JUTIAPA.

INSTITUTO SIMON BERGAÑO Y VILLEGAS, ESCUINTLA

ESCUELA OFICIAL RURAL PARA VARONES, LA DEMOCRACIA ESCUINTLA.

LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, RINCONCITO QUE ME VIO NACER

## AGRADECIMIENTOS

A:

Ing. Agr. Amilcar Sánchez, catedrático de la Facultad de Agronomía, por la asesoría, apoyo incondicional brindado, en la ejecución del presente trabajo.

Ing. Agro. Luís Mejía, por su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de la investigación.



## CONTENIDO

### PÁGINA

CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	4
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 MARCO CONCEPTUAL.....	5
3.1.1 Situación taxonómica .....	5
3.1.2 Mejoramiento genético del tomate.....	6
3.1.3 Resistencia.....	8
3.1.4 Mosca blanca.....	13
3.1.5 Virus.....	18
3.1.6 Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales.....	23
3.2 MARCO REFERENCIAL.....	28
3.2.1 Descripción del área experimental.....	28
3.2.2 Información general de líneas resistentes.....	30
3.2.3 Información general de líneas susceptibles.....	30
3.2.4 Material experimental utilizado.....	31
3.2.5 Fase de laboratorio.....	34
3.2.6 Antecedentes de la investigación.....	35
4. OBJETIVOS.....	38

4.1	Objetivos General.....	38
4.2	Objetivos Específicos.....	38
5.	HIPÓTESIS.....	39
6.	METODOLOGÍA.....	40
6.1	Fase de campo.....	40
6.1.1	Semillero.....	40
6.1.2	Preparación del terreno.....	40
6.1.3	Transplante.....	40
6.1.4	Control de malezas.....	41
6.1.5	Fertilización.....	41
6.1.6	Control fitosanitario.....	41
6.1.7	Cosecha.....	42
6.2	Metodología Experimental.....	42
6.2.1	Descripción de tratamientos.....	42
6.2.2	Diseño experimental.....	42
6.2.3	Unidad experimental.....	43
6.2.4	Variables respuesta.....	43
6.2.5	Análisis de la información.....	45
6.3	Fase de laboratorio.....	46
6.3.1	Extracción de ADN viral.....	46
6.3.2	Hibridación de ácidos nucleicos.....	47
6.3.3	Estimaciones de Concentración de ADN viral.....	48
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
7.1	Severidad de síntomas de virosis.....	50

7.1.1	Índice de severidad a los 30 días después del trasplante.....	50
7.1.2	Índice de severidad a los 60 días después del trasplante.....	52
7.2	Concentración de ADN viral.....	55
7.2.1	Amplificación de la sonda .....	55
7.2.2	Estimación de la concentración en diferentes disoluciones.....	56
7.3	Rendimiento total.....	60
7.3.1	Rendimiento por planta.....	60
8.	CONCLUSIONES.....	64
9.	RECOMENDACIONES.....	65
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	66
11.	APÉNDICES.....	68

## ÍNDICE DE CUADROS

		Página
<b>Cuadro 1.</b>	Descripción de las diferentes clases de respuestas de la planta ante las infecciones virales.	22
<b>Cuadro 2.</b>	Cultivares susceptibles a geminivirus pero portadores de otras características.	31
<b>Cuadro 3.</b>	Genotipos de tomate incluidos en la evaluación y su procedencia.	31
<b>Cuadro 4.</b>	Escala de índice de severidad de virosis	43
<b>Cuadro 5.</b>	Datos originales para la prueba de Friedman, para diseños en bloques completamente aleatorizados, para la variable del índice de severidad, monitoreado a los 30 días después del trasplante.	50
<b>Cuadro 6.</b>	Se presentan los rangos de las 24 observaciones para la variable índice de severidad de síntomas de virosis, a los treinta días después del trasplante.	51
<b>Cuadro 7.</b>	Datos originales para la prueba de Friedman para diseños en bloques completamente aleatorizados, para la variable del índice de severidad, monitoreado a los 60 días después del trasplante.	52
<b>Cuadro 8.</b>	Se presentan los rangos de las 24 observaciones para la variable índice de severidad de síntomas de virosis, a los treinta días después del trasplante.	53
<b>Cuadro 9.</b>	Identificación de las muestras analizadas en el laboratorio para el análisis de ADN viral.	55
<b>Cuadro 10.</b>	Valores estimados de la concentración de ADN.	57
<b>Cuadro 11.</b>	Datos originales para la prueba de Friedman para diseños en bloques completamente aleatorizados, para la variable de la concentración de ADN viral.	57

<b>Cuadro 12.</b>	Se presentan los rangos de las 24 observaciones para la variable concentración de ADN viral.	58
<b>Cuadro 13.</b>	Rendimiento por planta de fruto, de cada una de las repeticiones de los híbridos evaluados.	60
<b>Cuadro 14.</b>	Análisis de Varianza para la variable Rendimiento por planta de los híbridos evaluados.	61
<b>Cuadro 15.</b>	Prueba de Tukey para Rendimiento total de los híbridos de tomate evaluados.	61
<b>Cuadro 16.</b>	Distribución de cada parcela, con su respectivo numero de tratamiento y bloque.	68
<b>Cuadro 17.</b>	Grado de severidad de virosis.	68
<b>Cuadro 18.</b>	Escala propuesta de Índice de Severidad (DSI) de síntomas de virosis en los híbridos de tomate evaluados.	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1.</b>	Mosca blanca ( <i>Bemisia tabaci</i> G.), un insecto vector de geminivirus.	15
<b>Figura 2.</b>	Tipo de daño formado por el acolochamiento del tomate.	16
<b>Figura 3.</b>	Esquema que representa la localización aproximada de los fragmentos que se amplifican con algunos de los pares de iniciadores en los componentes A y B, utilizados para la detección de geminivirus bipartitas. Se incluye la región común (RC) y el nombre de cada indicador. Las flechas indican la dirección de la síntesis del ADN por los iniciadores.	20
<b>Figura 4.</b>	Diagrama esquemático de la reacción en cadena de la polimerasa. Perfil de temperaturas para cada paso por ciclo de PCR. 1 = Paso de Desnaturalización (95 °C); 2= paso de Apareamiento (55 °C); 3 paso de extensión (72 °C).	25
<b>Figura 5.</b>	Proceso de hibridación de ácidos nucleicos, para la detección de ADN de virus.	26
<b>Figura 6.</b>	Frutos de dos especies de tomate, <i>Lycopersicum esculentum</i> L. y <i>Lycopersium hirsutum</i> L.	30
<b>Figura 7.</b>	Híbridos comerciales, Elios, Tara y Silverado.	34
<b>Figura 8.</b>	Descripción de los Híbridos experimentales Llanero 1 y Llanero 7 (TT02-2298).	34
<b>Figura 9.</b>	Grado de severidad de la escala donde se observa una ausencia de síntomas visibles y la segunda síntomas severos en toda la planta y con mucho achaparramiento.	44
<b>Figura 10.</b>	Grado de severidad de síntomas de virosis en los genotipos de tomate evaluados.	54

- Figura 11.** Fotografía de gel en que se puede observar las bandas de aproximadamente 400 genoma de un geminivirus. 56
- Figura 12.** Membrana de nylon que nos muestra la señal emitida de los ácidos nucleicos proveniente de la sensibilización del sistema quimioluminiscente, de los tratamientos analizado que están infectadas por virus. 59
- Figura 13.** Rendimiento por planta (gramos) de los híbridos experimentales y comerciales evaluados. 63

**EVALUACIÓN DE HÍBRIDOS EXPERIMENTALES DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Miller) RESISTENTES A LA VIROSIS TRANSMITIDA POR MOSCA BLANCA (*Bemisia tabaci* Gennadius), EN DEMOCRACIA, ESCUINTLA.**

**EVALUATION OF TOMATO (*Lycopersicon esculentum* Miller) HYBRIDS RESISTANT TO VIROSIS TRANSMITTED BY THE WHITEFLY (*Bemisia tabaci* Gennadius), IN DEMOCRACIA, ESCUINTLA**

**RESUMEN**

Las enfermedades causadas por las infecciones de geminivirus, transmitidos por moscas blancas (*Bemisia tabaci* Gennadius) provocan verdaderas catástrofes en la producción del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller), con pérdidas extremadamente severas, especialmente para los pequeños agricultores de América Central.

El control de la diseminación de la enfermedad, conocida como el acolchamiento o encrespamiento de las hojas, es complicado, pues en él intervienen varios factores como insectos vectores, virus, cultivares, y malezas, que llegan a formar relaciones complejas, dinámicas y cambiantes.

La presente investigación es parte del proyecto de producción de híbridos resistentes a virosis transmitida por mosca blanca y su evaluación agronómica y molecular, el cual es apoyado por el Fondo de Desarrollo de Ciencia y Tecnología (FODECYT 11-00) y por el Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Tres materiales genéticos (híbridos) del cultivo de tomate experimentales, para ser usados en campo abierto, de consumo en fresco, crecimiento determinado, con resistencia a la virosis transmitida por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius), fueron incluidos en la presente investigación conjuntamente con los híbridos comerciales Silverado, Tara y Elios, este último se utilizó como control susceptible a la virosis. El ensayo se realizó en regiones cálidas, específicamente en La Democracia, Escuintla, efectuándose en el año 2003, con transplante en el mes de mayo. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones, bajo las condiciones de manejo agronómico de los agricultores de la zona.

Se midieron las variables de índice de severidad de síntomas de virosis, tomando las lecturas a los 30 y 60 días después del transplante, concentración de ADN viral en la planta a los 45 días después del transplante, y la producción de fruto de tomate expresada en gramos por planta, al momento de la cosecha, a cada uno de los tratamientos incluidos en la evaluación.

De los híbridos de tomate evaluados, estadísticamente presentaron la mayor resistencia a la virosis, los materiales Llanero 1, TT02-2301 y TT02-2298; mostrando que son menos sensibles a los geminivirus, expresando un menor grado de índice de severidad, que los híbridos comerciales (Elios, Silverado y Tara,) en los cuales se observaron una mayor expresión de síntomas, es considerado un indicativo de no resistencia a los geminivirus.

En cuanto la evaluación en la fase de laboratorio sobre la variable de estimación de concentración de ADN viral a diferentes diluciones se mostró en la gel que los híbridos comerciales (Elios, Silverado y Tara) mostraron presencia de señal positiva de muestras infectadas con ADN viral, mientras que los híbridos experimentales (Llanero 1 y TT2301) no se observó una señal positiva, sino una negativa.

En la presente investigación se puede observar que los híbridos experimentales tienen un alto potencial en cuanto a rendimiento, una alta resistencia a geminivirus, firmeza de fruto, que se podrían explotar, tratando de mejorar características de forma del fruto por medio del mejoramiento genético.

## 1. INTRODUCCIÓN

En el mundo se utilizan cada vez más híbridos en cultivos como el tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller), tanto para condiciones de cultivo protegido, como en pleno campo, con destino al mercado en fresco, para el procesamiento industrial o para otros usos. Estos ofrecen alta productividad y mayor adaptación a las condiciones abióticas de estrés, pueden poseer mayor número de genes de resistencia a diversos patógenos, y permiten la rentabilidad del trabajo de selección.

El cultivo del tomate juega un papel importante en la generación de ingresos para el productor ya que según FASAGUA, cuenta con un área sembrada en el país de 10,000 manzanas, generando 15,000 empleos y siendo la hortaliza de mayor consumo a nivel nacional, por ser una fuente de alimento y condimento en las comidas de los guatemaltecos. En la actualidad uno de los problemas de ese cultivo es la enfermedad conocida como el encrespamiento de la hoja que es transmitida por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) la cual ha causado pérdidas a los agricultores por el uso indiscriminado de los plaguicidas para el control de las poblaciones de la plaga, que resulta en una alta contaminación del ambiente, graves riesgos para la salud del agricultor, elevando considerablemente los costos económicos, obligándolos a abandonar la producción de dicho cultivo, a pesar de que se han hecho varios estudios relacionados con el control de la mosca blanca, ninguno había enfocado el problema desde la perspectiva del mejoramiento genético.

Hoy en día, sin embargo, el desarrollo de cultivares resistentes parece ser la mejor alternativa para su control, esté y otros atributos de resistencia y productividad son buscados en los cultivadores modernos de tomate, en consecuencia, la presente investigación es continuación del proyecto de producción de híbridos del cultivo de tomate resistentes a virosis transmitida por mosca blanca y su evaluación agronómica y molecular, dando como resultados la identificación de híbridos con altos niveles de resistencia a geminivirus, que viene

derivada del cruce de especies silvestres (*L. hirsutum*, y *L. peruvianum*), con líneas susceptibles a geminivirus pero resistente a otros patógenos, con rendimiento intermedio, y otras características agronómicas importantes.

Se realizó la presente investigación de campo, bajo las condiciones de manejo agronómico de los agricultores de la zona, en un campo abierto, utilizándose un diseño experimental de bloques completamente al azar, con seis tratamientos y cuatro repeticiones; los híbridos utilizados fueron: experimentales Llanero 1, TT02-2301 y TT02-2298 y comerciales Silverado, Tara Elios. La fase de laboratorio se realizó en la facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Los resultados de haber evaluado en una forma semicomercial los híbridos experimentales dieron a conocer su alta resistencia al complejo mosca blanca-geminivirus, presentando una mayor resistencia a los geminivirus transmitidos por mosca blanca que los híbridos comerciales.

Los híbridos experimentales Llanero 1 y TT2301 presentaron un menor grado de índice de severidad en los genotipos evaluados en la presente investigación. Se realizaron dos lecturas de toma de datos, una a los treinta días y la siguiente a los 60 días después del trasplante, e la cual se logró observar una alta resistencia a geminivirus, mostrando que son menos sensibles a los geminivirus (menor expresión de síntomas) que los híbridos comerciales (Elios, Silverado y Tara,) en los cuales se observaron una mayor expresión de síntomas, lo cual es considerado un indicativo de no resistencia a los geminivirus.

En cuanto la evaluación en la fase de laboratorio sobre la variable de estimación de concentración de ADN viral a diferentes disoluciones se mostró en la gel que los híbridos comerciales (Elios, Silverado y Tara)

dieron presencia de señal positiva de muestras infectadas con ADN viral, mientras que los híbridos experimentales (Llanero 1 y TT2301) no se observó una señal positiva, sino una negativa.

De la presente evaluación efectuada determinamos que los híbridos experimentales tienen un alto potencial en cuanto a rendimiento, una alta resistencia a geminivirus, firmeza de fruto, que se podrían explotar, tratando de mejorar características de forma del fruto por medio del mejoramiento genético.

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Desde el año 1989 en Guatemala se detectó uno de los principales factores bióticos que afecta al cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) comúnmente conocido esta enfermedad viral como el acolchamiento o encrespamiento de las hojas. Es causada por geminivirus, transmitida por mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius), la cual llega a provocar pérdidas económicas del cien por ciento, que han obligado a los agricultores a abandonar la producción, en algunos casos.

El control de la diseminación de la enfermedad es complicado, pues en él intervienen varios factores, como insectos vectores, virus, cultivares y malezas que podrían ser reservorios del patógeno. Dichos factores forman relaciones complejas, dinámicas y cambiantes.

En la actualidad, no existen alternativas en el mercado local de cultivares con resistencia genética de los principales patógenos del cultivo, donde los productores para combatir este problema recurren en forma unilateral a la aplicación de plaguicidas, además presionar a la mosca blanca a seleccionarse para resistencia a los mismos, tienen un alto costo económico, contaminación del ambiente, biodiversidad, riesgos para la salud, tanto de los productores como de los consumidores.

Actualmente el manejo más efectivo es la resistencia genética a través del fitomejoramiento a los principales patógenos que afectan este cultivo es una alternativa que permitirá reducir la dependencia de la protección química, resultando en cultivo más seguros, más económicos y con un menor impacto ambiental.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 MARCO CONCEPTUAL

##### 3.1.1. Situación Taxonómica

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas. Los miembros de esta familia presentan haces bicolaterales, sus flores son radiales y con cinco estambres. El ovario, súpero, bicarpelar, contiene numerosos primordios seminales, produciendo bayas polispermas. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor (19). Con la domesticación y cultivo es frecuente observar flores con mayor número de pétalos y sépalos, así como ovarios multiloculares, en adición al bilocular que podríamos considerar normal (19).

Siguiendo la taxonomía generalmente aceptada es:

Clase: *Dicotyledoneas*.

Orden: *Solanales (Personatae)*.

Familia: *Solanaceae*.

Subfamilia: *Solanoideae*.

Tribu: *Solaneae*.

Género: *Lycopersicon*.

Especie: *Lycopersicon esculentum*.

### 3.1.2 Mejoramiento genético del tomate

Es una especie diploide con  $2n = 24$  cromosomas, en la cual existen numerosísimas mutantes monogénicas (8). La flor es hermafrodita y su estructura asegura una estricta autogamia. Las plantas de la especie *Lycopersicon esculentum*, son auto compatibles. Debido a su autogamia el tomate cultivado presenta una variabilidad reducida para determinados caracteres, a pesar de su gran diversidad aparente. Es a las especies silvestres a las que el fitomejorador puede recurrir para aumentar su variabilidad; de hecho, el tomate es la especie cultivada en la cual han sido más utilizado estas especies en los programas de selección. De ahí que todos los genes de resistencia a las enfermedades presentes en los cultivares poseen al menos un gen proveniente de las especies silvestres (8).

#### A. La Especie Silvestre

Son plantas herbáceas, anuales o perennes. Todas son diploides con el mismo número de cromosomas que el tomate cultivado ( $2n=24$ ). Las hay fuertemente autogamas, otras son alógamas y algunas de ellas auto incompatibles (8).

#### B. Híbrido

Producto de un cruzamiento entre variedades o líneas genéticas no emparentadas. Las semillas F1 de tomate solo pueden sembrarse una vez, ya que las semillas de tales híbridos no reproducen con exactitud el

híbrido y habrá una reducción en el rendimiento y en la uniformidad (23). Las ventajas sobre variedades es una mejor calidad, mayor productividad, mayor resistencia a enfermedades, crecimiento vigoroso, mejor adaptabilidad y maduración mas temprana (23).

### C. Variación Genética

El tomate cultivado es una de las nueve especies pertenecientes al genero *Lycopersicon*. A pesar de que su consumo esta prácticamente limita a las variedades domesticas de *Licopersicon esculentum*, se utilizan también, aunque en menor cantidad, los frutos de la variedad silvestre cerasiforme y de la especie a fin *Lycopersicon pimpinellifolium*. Los frutos de otras especies tienen colores y sabores menos atractivos que el *Lycopersicon esculentum* muchas son francamente repugnantes.

Las especies silvestres tienen un gran valor potencial, dada la diversidad de su plasma germinal. Han sido hibridadas con formas cultivadas por el interés de sus genes de resistencias a diversas enfermedades y para mejorar el color y la calidad de sus frutos, muchas variedades así mejoradas se cultivan en gran escala.

### D. Producción de Semillas

Para la obtención de buena semilla, se debe de esforzar en la producción de buena calidad. Si se siembra semillas de mala calidad que provienen de variedades de tomates mal adaptadas en el cultivo, no se producirán utilidades, aunque se apliquen cantidades suficientes de fertilizantes, plaguicidas u otras prácticas de cultivo. Solamente se puede disponer de semillas sin daños, con buena capacidad de germinación y libres de mezclas con otras variedades, y de enfermedades transmitidas por el suelo, con una tecnología

apropiada de producción de semilla. No hay duda de que sería una gran ventaja para cualquier nación en desarrollo producir sus propias semillas de tomate (9).

#### E. Avances en el Mejoramiento Genético del Tomate

Recientemente los investigadores han hecho notables progresos en el desarrollo de variedades y líneas genéticas resistentes a enfermedades; en la comprensión de las causas de cuajamiento bajo de frutos; en el mejoramiento de la calidad del tomate fresco y de elaboración; y en la transferencia de rasgos útiles de especies silvestres a especies cultivadas. Por lo tanto, el mejoramiento de plantas es una actividad que merece ser desarrollada en las condiciones de nuestros países, apoyándose con las distintas técnicas modernas, para que al obtener nuevos cultivares adaptados a las condiciones de cada país se aporte una alternativa de solución a los problemas de la seguridad alimentaria y una producción limpia, en armonía con el medio ambiente (23).

#### **3.1.3 Resistencia**

Es un medio privilegiado para controlar enfermedades provocadas por virus, bacterias, hongos y nemátodos. La resistencia es toda característica heredable que permite una disminución de la incidencia de un agente patógeno o de un depredador sobre la cantidad o calidad de una cosecha. La eficacia de una resistencia proviene de la combinación de dos factores: El nivel de expresión de la misma y su estabilidad en el tiempo o durabilidad, ambos factores poseen su propio determinismo (8).

## A. Mejoramiento de plantas resistentes a insectos

El objetivo principal de los programas sobre la resistencia a los insectos en las plantas domésticas, es desarrollar cultivos resistentes a una plaga entomológica a la vez que se mantienen, o mejoren, sus características agronómicas fundamentales. La resistencia a insectos debe ser un objetivo básico de los programas de mejoramiento vegetal realizados por genetistas vegetales; asimismo, para los entomólogos, el desarrollo de plantas domésticas resistentes al ataque de insectos debe formar parte integral de las estrategias de control de estos últimos (14).

En ocasiones la resistencia es una simple característica que contribuye en forma secundaria, en otras, el principal mecanismo de control de una plaga. En la mayoría de los casos, la resistencia a los insectos se emplea como coadyuvante de otros medios de control, los cultivos resistentes requieren tratamiento menor con un plaguicida, o necesitan proporciones menores de otros mecanismos de control (15).

### a. Resistencia vegetal

Aquellas características que permiten a la planta evitar, tolerar o recuperarse de los ataques de insectos, en condiciones que dañarían más gravemente a otras plantas de la misma especie (14).

Resistencia es la capacidad que tiene la planta huésped para reducir la infestación por otros patógenos, el daño causado por estos, o ambas cosas. Los niveles de resistencia varían desde una ligera defensa de la planta contra los insectos, hasta total inmunidad y la resistencia es resultado de uno o más mecanismos (14).

La resistencia a los insectos funciona como mecanismo de control en ciertos nichos, en los cuales no son factibles otros medios de control o se hace difícil su aplicación; 1) cuando existe un ritmo crítico en el ciclo de vida insecto, en el cual, éste es vulnerable sólo durante un breve periodo; 2) la cosecha es de escaso valor económico; 3) la plaga se presenta en forma continua. 4) no se dispone de otros medios de control (14).

#### b. Clasificación de la Resistencia

Las clasificaciones del fenómeno de resistencia pueden expresar el éxito o la falla relativas de una especie de insectos para sobrevivir, desarrollarse y reproducirse sobre una especie vegetal, o también describir el daño real infligido al huésped, en términos cualitativos o cuantitativos (14).

En la planta, la expresión y estabilidad de la resistencia a una especie de insectos depende del genotipo de la planta, el genotipo del insecto y la interacción genética entre la planta y el insecto en diferentes condiciones ambientales (14).

#### c. Mecanismos de Resistencia Vegetal

Una planta puede tener resistencia vegetal (habilidad hereditaria de un cultivar para producir mayor cantidad de cosecha que la que producirán otras variedades igualmente infestadas) atribuible a cualquiera de los cuatro mecanismos o combinaciones de ellos, (antixenosis o no preferencia, antibiosis, tolerancia y evasión).

Antixenosis (no-preferencia), es la respuesta del insecto ante plantas que carecen de las características necesarias para servir como huéspedes y es resultado de reacciones negativas, o total abstinencia, durante la búsqueda de alimento, sitios de oviposición o refugio.

Antibiosis, abarca a todos los efectos adversos que la planta ejerce en la biología del insecto, (sobrevivencia, desarrollo y reproducción) (14).

Tolerancia, incluye todas las respuestas de la planta que provocan en ella la capacidad de tolerar la infestación y sostener a poblaciones de insectos que dañarían de modo severo a plantas susceptibles (14).

#### d. Tipos de resistencia

Resistencia horizontal, este término se emplea para describir una situación en la cual una serie de parcelas sembradas con la misma especie vegetal, infestadas por una serie de patógenos diferentes no presenta interacciones diferenciales. En otras palabras, el nivel de resistencia que ofrece una especie vegetal cualquiera es igual contra todos los biotipos del insecto y viceversa. También se utilizan los términos de resistencia no específico para el biotipo o resistencia vegetal. Por lo general la resistencia horizontal es poligénica y se le considera estable y permanente (14).

Resistencia vertical, este término se aplica cuando una serie de parcelas de la misma especie vegetal infestadas por una serie de patógenos diferentes presentan interacciones diferenciales. En otras palabras algunas variedades se clasifican, resistentes y sufren poco o ningún daño; otras son susceptibles cuando las

infesta el mismo biotipo del insecto. Otro término en uso es: Resistencia específica para el biotipo. La resistencia vertical depende de genes mayores y se le considera menos estable que la resistencia horizontal.

## B. Resistencia a Virus de Plantas

La identificación y creación de resistencia a las principales virosis que afectan a las plantas cultivadas y el estudio de los mecanismos mediante las que operan, constituyen un área de interés creciente en las Ciencias Agrarias.

Las razones de este interés creciente son variadas y su análisis debería considerar distintos componentes. Probablemente el avance en la eficacia de la lucha química contra otros patógenos de las plantas, no es ajeno a una nueva situación, en la que los virus, antes considerados patógenos menores ( en comparación con hongos, insectos o malas hierbas) adquieren una importancia cada vez mayor. Desgraciadamente, no existe nada parecido a un “viricida” con el que combatir con éxito las infecciones virales de las plantas, lo cual añade un interés adicional a las situaciones de resistencia (13).

### a. Resistencia en la infección sistémica

El término resistencia es implícitamente un término comparativo. Para que una planta pueda ser considerada resistente a la infección por un virus determinado, es preciso compararla con alguna otra planta que pueda ser infectada por ese virus. Una planta con estas características se considera susceptible a la

infección por el virus. Estos dos conceptos (resistencia y susceptibilidad) son la clave para cualquier tratamiento mecanístico de la interacción entre un virus y su planta huésped. En general, la susceptibilidad de una planta a un virus se mide por la permisividad que esa planta ofrece para la replicación del virus en la célula inicialmente infectada y su dispersión por toda la planta, alcanzando valores de concentración (título viral) variables según la combinación virus-huésped (13).

Esta invasión sistémica de la planta suele ir acompañada de la expresión de una cierta sintomatología. Entre los síntomas más frecuentes de las infecciones virales se encuentran los mosaicos foliares (alternancia de zonas verde y amarillentas en la superficie de la hoja), amarillamientos y deformaciones de las hojas, enanismo, aparición de zonas necróticas y otros, entre los cuales se puede encontrar la muerte de la planta, en combinaciones virus-planta especialmente graves (13).

### **3.1.4 Mosca blanca**

Con el nombre vulgar de “moscas blancas” se conocen a especies de la familia *Aleyrodidae* cuyos adultos tienen el cuerpo recubierto de una fina capa de polvillo blanco de aspecto harinoso (alearon = harina), producido por unas glándulas ceras ventrales. Ver figura 1 (19).

Dos especies tiene particular significado en el cultivo del tomate: *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*. Morfológicamente las dos especies se parecen mucho, aunque las connotaciones de la segunda son más graves por su aptitud para transmitir virosis que afectan al tomate (19).

*Bemisia tabaci* ha sido capaz de desarrollar biotipos, es decir, poblaciones con características morfológicas similares a la especie original, pero diferentes en sus hábitos, su habilidad reproductiva, su capacidad para adaptarse a condiciones nuevas o adversas y para atacar cultivos que antes no atacaban. Así, ha desarrollado biotipos adaptados a condiciones ambientales anteriormente inconvenientes para ella; algunos de estos biotipos han adquirido resistencia a muchos insecticidas principalmente fosforados y piretroides (22).

Las moscas blancas presentan una metamorfosis incompleta, pasando por las etapas de huevo, ninfa y adulto. Sin embargo, existen algunas modificaciones a este esquema. El último estadio ninfal se convierte en una pseudopupa que casi todos los autores llaman pupa, porque realmente reduce un poco su metabolismo pero técnicamente sigue considerándose como una ninfa, las ninfas también son llamadas larvas por algunos autores incorrectamente (22).

La duración del ciclo de vida varía según la especie. Pero además, otros factores pueden influir en ello, de los cuales la temperatura es el más determinante. En *B. tabaci* el ciclo dura aproximadamente 19 días a 32 °C no obstante, puede alargarse hasta 73 días a 15 °C, o ser menor de 19 días a temperaturas altas, superiores a los 32 °C (22).

La reproducción de las moscas blancas puede ser sexual o por partenogénesis. Cuando es sexual, es decir, con la participación del macho y la hembra, la prole va a ser también de machos y hembras. En forma facultativa existe la posibilidad de que haya partenogénesis, es decir, la producción de nuevos individuos sin la necesidad de que la hembra sea fecundada por el macho; en el caso de *Bemisia tabaci* se producen únicamente machos (arrenotaquia). Esto tiene influencia en la facilidad con que muchos insectos

desarrollan resistencia a insecticidas o desarrollan nuevos biotipos (22).

El ámbito hospedante varía según la especie. Algunos géneros, como *Aleurocanthus* y *Dialeurodes*, han sido reportados en pocas especies vegetales. En cambio, *Bemisia tabaci* tiene 506 especies documentadas hasta ahora, pertenecientes a 84 familias, entre las cuales sobresalen Compositae, Leguminosae, Cucurbitaceae y Solanaceae; también puede desarrollarse en Umbelliferae y hasta en Poaceae (22).



**Figura 1.** Mosca blanca (*Bemisia tabaci* G.), un insecto vector de geminivirus.

#### A. Tipos de Daño

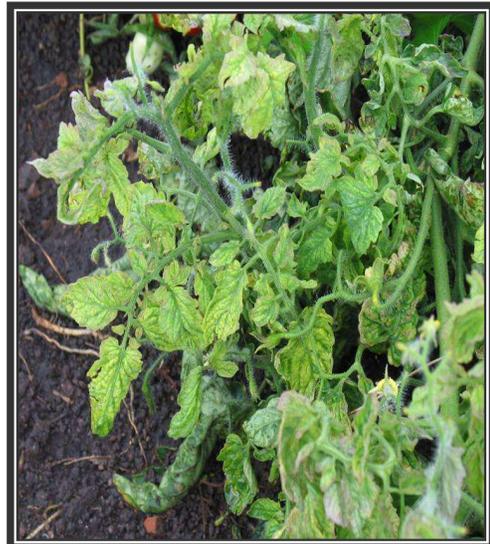
*Bemisia tabaci* es importante por ser transmisor de enfermedades virales, ya que son vectores de 30 virus pertenecientes al grupo de los geminivirus; entre las enfermedades transmitidas se encuentran: el chino del tomate, amarillamiento de la venación del pepino, enchinamiento de la hoja de la calabaza, mosaico común del frijol. Al alimentarse de savia, específicamente en el floema, a través del envés de las hojas, inducen amarillamiento, achaparamiento y formación de frutos de baja calidad, observar en la figura 2 (3).

Otro daño es producido por la secreción de miecilla que origina la “fumagina” que al cubrir la superficie

de la hoja interfiere en los procesos fotosintéticos de la planta, disminuyendo esta actividad parcial o totalmente, además de causar asfixia debido al taponamiento de las estomas. Transmisión de geminivirus (que también es un daño indirecto), es el factor más complicado, debido a que estos atacan el sistema vascular, lo que provoca severas formaciones en las hojas y otros órganos de la planta (3).

Esto obstaculiza el proceso fotosintético. El daño más visible aparece especialmente en las hojas causando lo que se conoce con el nombre de “acoloramiento del tomate” los rendimientos se reducen significativamente y en el peor de los casos no se obtiene cosecha debido a que la planta aborta la totalidad de las flores y frutos ya cuajados; además los frutos que se logran cosechar son de mala calidad, pequeños y de color poco atractivo; en muchos casos aparece la mitad del fruto maduro y la otra parte aun verde; esto tiene como consecuencia que cuando el tomate se utilice en las plantas productoras de salsa o pasta les tenga que agregar colorante artificiales porque el color natural de las frutas no es suficiente para hacer atractiva la salsa (3).

¡Error!



**Figura 2.** Tipo de daño formado por el acoloramiento del tomate.

## B. Relación *Bemisia tabaci* con los geminivirus

Esta relación es del tipo persistente-circulativo, lo cual significa que las partículas virales adquiridas por el insecto durante su alimentación circulan dentro de su cuerpo, pasando del intestino a la hemolinfa hasta llegar a las glándulas salivales. Cuando una mosca infectiva se alimenta en una planta sana, inocula junto con la saliva las partículas virales, colocándolas eficazmente en el tejido específico en el cual estas se multiplican, como lo es el sistema vascular de la planta (12).

Aunque las ninfas pueden adquirir el virus al alimentarse, su hábito sedentario o senil impide jugar algún papel en la transmisión del virus, desde el punto de vista epidemiológico. En cambio, los adultos son vectores muy eficientes de los geminivirus. El adulto puede adquirir el virus de una planta enferma al alimentarse por apenas 4 horas, como sucede con el virus del mosaico amarillo del tomate; de periodo de adquisición. Después de un período de latencia que puede variar entre 4 a 20 horas, según el virus y la temperatura ambiental, la mosca esta en capacidad de transmitir los geminivirus en forma intermitente por un periodo de 10 días o hasta 20 días en casos excepcionales (12).

## C. Resistencia a insecticidas

Se define como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjuntos de ellos que los capacita fisiológicamente para bloquear, ya sea por mecanismos metabólicos o no metabólicos, la acción toxica de insecticidas y, en consecuencia sobrevivir a la exposición de dosis que para otros seria letal (4). Las causas del desarrollo de resistencia o presión de selección, es el uso irracional de insecticidas que

provoca una fuerte presión de selección eliminando solo aquellos que son susceptibles. Otra es el uso de insecticidas con un solo sitio de detoxificación el cual puede ser fácilmente atacado (4).

### 3.1.5 Virus

Se han descrito más de cuatrocientos virus de plantas que se clasifican en unos treinta y cinco grupos, hoy considerados géneros, en función de la naturaleza de su material genético (ADN o ARN, monocatenario o bicatenario, de sentido mensajero o complementario) de la estructura y propiedades de la partícula viral o virión y de características biológicas como la forma de transmisión (13). La mayor parte de estos virus, y de los grupos taxonómicos en que se clasifican, tienen como material genético moléculas de ARN monocatenario (de una sola banda) con polaridad de ARN mensajero (o positiva) (13).

En su forma más simple se caracterizan por poseer un solo tipo de ácido nucleico, el cual es la parte infecciosa de la partícula viral, y por una o más proteínas que lo recubren, confiriéndole una morfología típica y protegiendo al ácido nucleico, para evitar su degradación. Los virus que afectan a las plantas tienden a ser menos evolucionados que aquellos que afectan a los animales (12).

#### A. Características de los virus

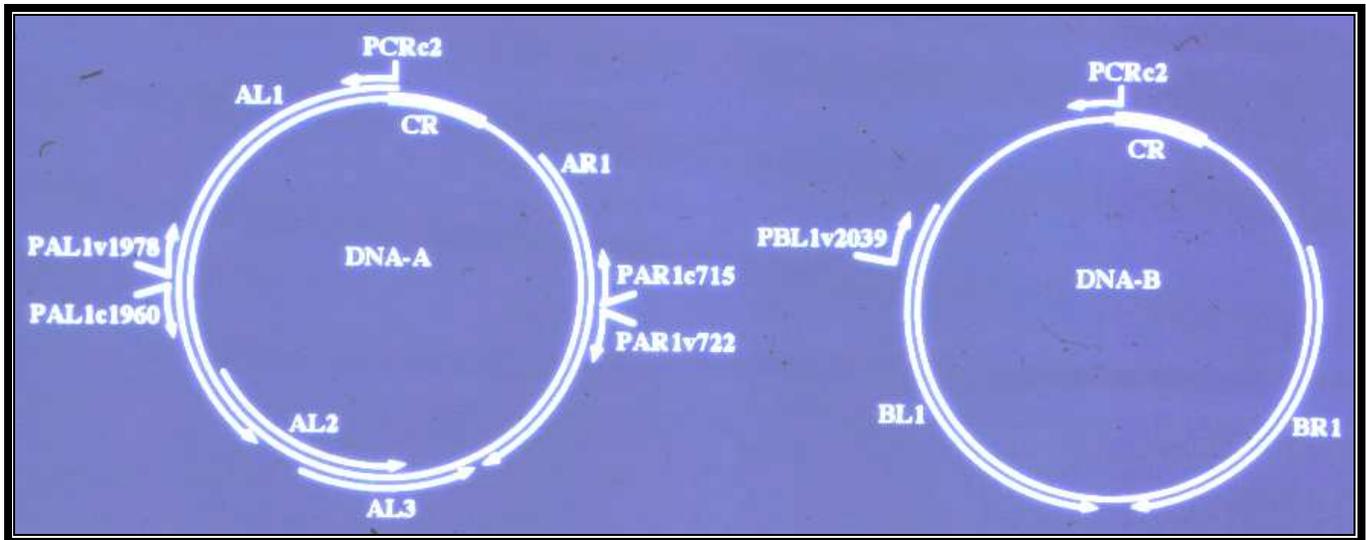
Los geminivirus constituyen un grupo especial de virus vegetales, ya que a diferencia de la mayoría de estos cuyo genoma está constituido por ARN, estos contienen ADN (12).

Químicamente, las partículas virales corresponden en el 80 % a una proteína cuyo peso molecular varía entre 27000 y 32000 daltons, según el geminivirus de que se trate, y el ácido nucleico corresponde a una molécula circular de cadena simple (ADN-SC) por cada uno de los componentes de la partícula viral; el contenido de ADN representa el 20 % del total de la partícula y la molécula consta de 2265 a 3200 nucleótidos según el geminivirus. En cuanto a su actividad, los geminivirus se multiplican en las células del floema de las plantas infectadas, específicamente en el núcleo, donde se acumulan las partículas virales formando masas densas, las cuales pueden llegar a ocupar un volumen considerable del núcleo (12).

## B. Geminivirus

Las enfermedades causadas por virus pertenecientes al grupo de los geminivirus (geminini = gemelo) (13). Los virus tienen partículas de un aspecto germinado y contienen un genoma constituido por DNA circular monocatenario. En esa familia se incluyen especies virales relativamente distantes filogenéticamente, cuyo genoma puede estar formado por una (monopartitos) o dos (bipartitos) moléculas de DNA, ver figura 3 (16).

Según Harrison (10) la mayoría de los virus de plantas conocidas poseen partículas isométricas o alargadas conteniendo cadenas sencillas de ADN.



**Figura 3.** Esquema que representa la localización aproximada de los fragmentos que se amplifican con algunos de los pares de iniciadores en los componentes A y B, utilizados para la detección de geminivirus bipartitas. Se incluye la región común (RC) y el nombre de cada indicador. Las flechas indican la dirección de la síntesis del ADN por los iniciadores.

### C. Efecto de la infección por virus

La mayoría de los virus afectan adversamente al organismo que infectan. En muchos casos el daño se debe a que las células infectadas alteran su metabolismo, dando origen a la producción de partículas virales, lo que causa graves daños a nivel celular afectando el desarrollo de la planta. En cuanto a los geminivirus, el número de partículas producidas como consecuencia de la infección es relativamente pequeño, y no guarda relación con el enorme daño que causa a las plantas afectadas área (12).

## D. Reconocimiento virus-huésped

Comienzan a conocerse factores virales y del huésped que contribuyen a determinar la gama de huéspedes, el tipo de respuesta a la infección y la sintomatología que se desarrolla, aunque se desconocen los diversos conjuntos de interacciones moleculares entre el virus y el huésped responsables de los distintos tipos de enfermedad (13).

### a. Gama de huéspedes

Los virus pueden infectar solamente un número limitado de organismos, lo que constituye la gama de huéspedes. Una planta es susceptible a un determinado virus si posee todos los componentes necesarios para llevar a cabo la replicación viral y la infección sistémica. La resistencia es el resultado de la interrupción de una de las etapas del ciclo viral: (a) entrada en la célula, (b) desencapsidación del ácido nucleico, (c) expresión del genoma viral, (d) replicación del genoma viral, (e) ensamblaje de la descendencia viral y (f) movimiento del virus a nuevas células y a nuevos huéspedes.

Podemos diferenciar varias clases de respuestas de la planta ante la infección viral según cuadro 1.

**Cuadro 1.** Descripción de las diferentes clases de respuestas de la planta ante las infección virales.

Clase de Respuesta	Descripción
Susceptibilidad total.	El virus puede replicarse e invadir sistemáticamente la planta, pudiendo producir síntomas o no.
Respuesta hipersensible o susceptibilidad inicial.	En una primera fase el virus se replica y comienza a moverse. La planta responde induciendo una cascada de procesos antivirales que limitan la infección a una pequeña zona alrededor del punto de entrada. La región afectada suele necrosarse, pero el resto de la planta permanece libre de virus.
Susceptibilidad limitada.	Debida a una reducción general de la replicación y del movimiento viral. En la que el virus se replica y se mueve normalmente en la hoja inoculada, pero es incapaz de propagarse a otras áreas de la planta, por la que ésta nunca sufre infección sistémica. En la que el virus es capaz de replicarse, pero está confinado en las zonas iniciales de infección por un defecto en el movimiento célula a célula.
Resistencia a la infección.	En la que un limitado porcentaje de las plantas resulta infectado.
Inmunidad real.	El virus es incapaz de replicarse incluso en las células inicialmente infectadas.

Hay que tener en cuenta que pueden coexistir varios tipos de respuesta ante una infección viral y que ésta puede verse alterada por gran número de factores ambientales y por la infección simultánea con otros virus, que en algunos casos pueden actuar como auxiliares, aportando funciones necesarias para la infección (13).

### 3.1.6 Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales

Los métodos de detección y cuantificación del DNA viral se basan en la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores generales y específicos y en la hibridación molecular con sondas marcadas, general y específicas. Tal vez desafortunadamente, no existe un único método de diagnóstico útil para identificar todos los patógenos virales de plantas, donde cada método posee sus limitaciones y con frecuencias para llegar a la identificación de un virus es necesario utilizar más de uno de ellos (13).

Las técnicas que detectan los ácidos nucleicos virales (análisis de ARNs bicatenarios, hibridaciones moleculares y la reacción en cadena de la polimerasa) son un complemento a las técnicas serológicas, ya que detectan distintas partes del virus que éstas (13).

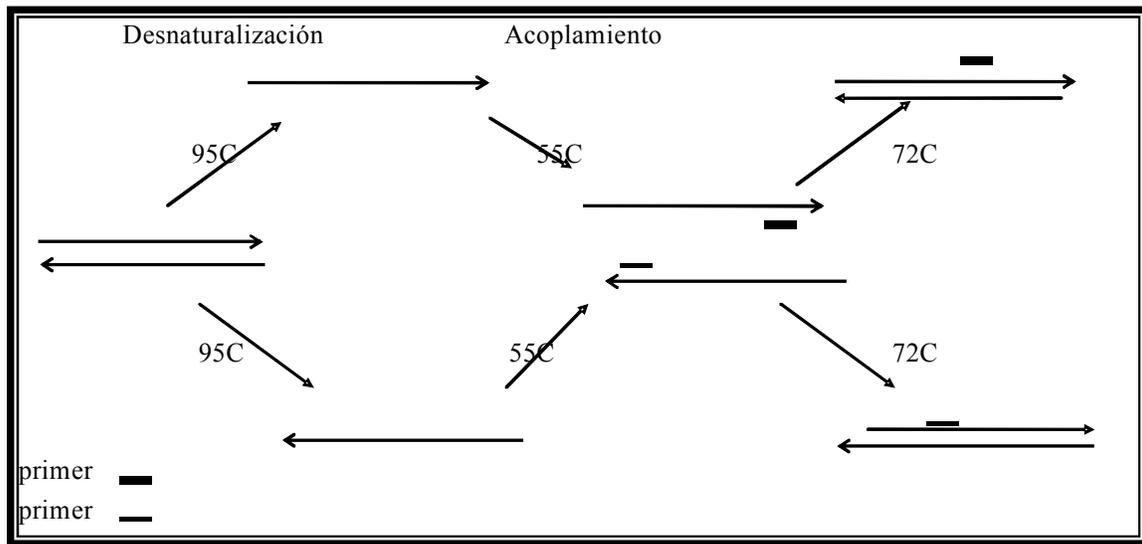
#### A. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que consiste en producir múltiples copias de un segmento determinado de ADN, se ha convertido en estos últimos años, en la técnica más utilizada en biología molecular por ser rápida, sencilla y muy sensible. Con este ensayo teóricamente se puede amplificar una sola molécula de ADN, lo que permite la detección de copias únicas de genes. Esta técnica es utilizada para amplificar un fragmento específico de ADN localizado entre dos regiones de secuencia nucleotídica conocida, y frecuentemente a partir de una cantidad extremadamente pequeña de ácido nucleico en una muestra biológica compleja (13).

La especificidad del PCR se basa en el uso de oligonucleótidos, llamados iniciadores o primers, que son complementarios a las regiones en ambos extremos del fragmento a ser amplificado. Debido a la sensibilidad y a la especificidad de las técnicas de PCR, estos procedimientos encuentran una gran aplicación en la detección de patógenos vegetales, y pueden utilizarse para responder preguntas relacionadas con la identificación de los patógenos, las poblaciones y la variabilidad. Los fragmentos amplificados pueden ser luego caracterizados por fraccionación de acuerdo a peso molecular en geles de agarosa, restricción por digestión enzimática, hibridación con sondas o por secuenciación del ADN

#### a. La amplificación del ADN

El proceso de amplificación del ADN por PCR se explica en la Figura 4. Se lleva a cabo a través de dos pequeños fragmentos de ADN o “cebadores”, de secuencia complementaria a la de los extremos del fragmento que se desea amplificar, mediante ciclos sucesivos de desnaturalización térmica del ADN, anillado de los cebadores a las secuencias complementaria y extensión de los cebadores anillados mediante una ADN polimerasa termoestable. En una reacción típica, se calienta a 92-95 °C para desnaturalizar el ADN bicatenario en 2 cadenas sencillas. A continuación la reacción se enfría a 37 – 60 °C para anillar los cebadores específicos a las cadenas de ADN. Finalmente, la reacción se calienta a 72 °C, la temperatura óptima de reacción de las ADN polimerasas termoestables para extender las cadenas a partir de los cebadores y producir dos copias de las cadenas originales. Estos ciclos de temperatura se llevan a cabo 25 – 40 veces. Dado que los productos de extensión son a su vez complementarios a los cebadores, en cada ciclo se duplica la cantidad de ADN sintetizada en el ciclo anterior, de forma que hay una amplificación exponencial del fragmento, teóricamente  $2^n$  después de  $n$  ciclos de amplificación (13).



**Figura 4.** Diagrama esquemático de la reacción en cadena de la polimerasa. Perfil de temperaturas para cada paso por ciclo de PCR. 1 = Paso de Desnaturalización (95 °C); 2= paso de Apareamiento (55 °C); 3 paso de extensión (72 °C).

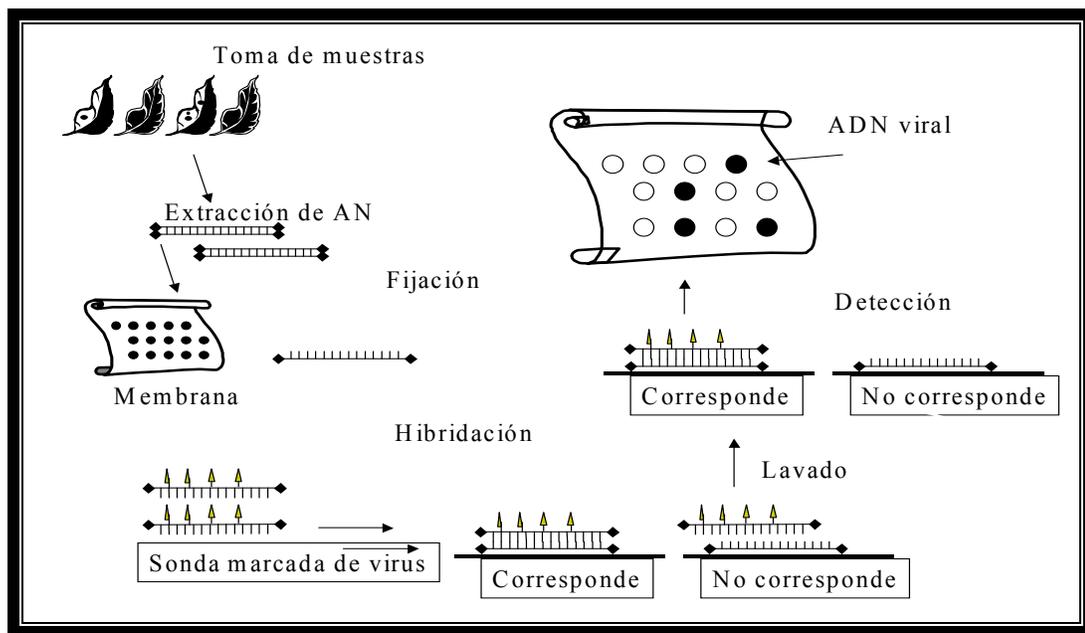
## B. Hibridaciones moleculares

A lo largo del tiempo las mutaciones van produciendo cambios en la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos que dan lugar a la variación genética en los organismos vivos. El principio de hibridación para diagnóstico se basa en que organismos estrechamente relacionados presentan una homología de secuencia nucleotídica mayor que aquellos que están más distantes. Por tanto, una secuencia que esté presente en una cepa viral determinada pero ausente en otras cepas puede utilizarse para una identificación específica de esta cepa. En cambio, una secuencia muy conservada presente en todas las cepas de un virus puede utilizarse para detectar todas ellas (13).

a. Detección mediante hibridaciones moleculares

La detección de virus por hibridación molecular se realiza mediante la unión del ácido nucleico del genoma viral con moléculas de ácido complementarias (sonda), que han sido marcadas con un isótopo radiactivo u otra molécula no radiactiva (biotina, digoxigenina, quimioluminiscencia, etc) que permite detectar la hibridación.

La técnica, esta esquematizada en la figura 5. En primer lugar se inmoviliza el ADN o ARN de la muestra desnaturalizado sobre un soporte o filtro, de forma que se impide la auto hibridación, que puede ocurrir en medio liquido. A continuación se introduce el filtro en una solución con sondas de ácidos nucleicos complementarias y marcadas. Tras la hibridación, es necesario lavar los filtros para eliminar los productos que no han reaccionado. Los híbridos muestra-sonda se detectan por auto radiografía, en el caso de sondas marcas con  $^{32}\text{P}$  o por métodos enzimoimmunoquímicos (13).



**Figura 5.** Proceso de hibridación de ácidos nucleicos, para la detección de ADN de virus.

La concentración del genoma viral en las células vegetales es indicativa de su capacidad de replicación en un genotipo determinado. La cuantificación del DNA viral y su correlación con la sintomatología y el rendimiento pueden utilizarse como criterios adicionales de selección en los programas de mejoramiento genético (16).

#### b. Aplicaciones de las hibridaciones moleculares a la virología vegetal

Una de las aplicaciones más importantes de las hibridaciones moleculares a la Virología Vegetal ha sido en el diagnóstico de enfermedades virales. A pesar de la dificultad que presenta la necesidad de disponer de sondas específicas para cada virus, la técnica ofrece ventajas considerables como puede ser su sensibilidad, lo que es útil especialmente para virus que están limitados la floema o infectando árboles o en la detección de los virus en su insecto vector, para los que con las técnicas tradicionales no se obtienen unos resultados eficientes (13).

## 3.2. MARCO REFERENCIAL

### 3.2.1 Descripción del área experimental

#### A. Ubicación Geográfica

La investigación se realizó en la Finca La Esmeralda, que está ubicada en el municipio de la Democracia del Departamento de Escuintla, a 98 kilómetros de la ciudad Capital, está a una altura a 110 msnm, geográficamente la finca esta ubicada en latitud norte de 14 grados, 12 minutos y 9 segundos, longitud oeste de 90 grados, 58 minutos con 15 segundos.

#### B. Vías de Acceso

El acceso es por medio de una carretera asfaltada hasta el municipio de la Democracia (KM 90) y de aquí hacia la finca es camino de terretería (8 km.) al casco de la Finca.

#### C. Fisiografía

La Finca tiene una área de 120 manzanas; esta ubicada naturalmente en la cuenca del río Cologate de la vertiente del Pacífico, la zona de vida de esta región es el bosque húmedo subtropical cálido. La fisiografía predominante pertenece a las llanuras costeras.

#### D. Condiciones Climáticas

El clima de la región según Thornthwaite, presenta las características siguientes; cálido sin estación fría bien definida, húmedo y con envició seco. Temperatura medio anual de 28 °C con una precipitación media anual de 1000 mm, y una humedad relativa anual entre 60 a 80 %. Vientos: en la costa del Pacífico, completamente abierta hacia el océano, se verifican cotidianamente variaciones que en dichos lugares se conocen respectivamente como; brisas del mar y brisas de tierra. El isobalance anual es negativo entre – 400 mm y -600 mm.

#### E. Características edáficas

El tipo de suelo es de Grupo 8 y leyenda III/S1 lo que describe suelos superficiales limitados por la presencia de “talpetate” (Andisoles superficiales). En el estudio semidetallado de suelos de la zona cañera de Guatemala indica que la clasificación de suelos es de textura gruesa, profunda y permeable. El relieve es plano con una Profundidad de más de un metro, teniendo un buen drenaje, donde no se tiene problemas con salinidad, la erosión es ligera. El lugar no presenta áreas con vetas arenosas.

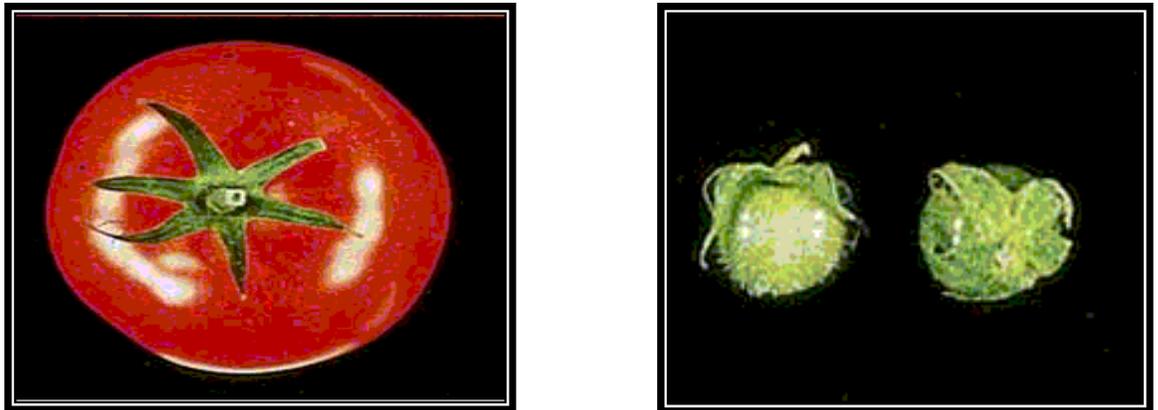
#### F. Agua

Se presenta en todo el área en la época de invierno de los meses de mayo a noviembre, habiendo una precipitación medio anual de 1,500 a 1,600 mm., disponibilidad solo los primeros 3 meses de verano de agua.

### 3.2.2 Información general de líneas resistentes

Las líneas seleccionadas de los híbridos FAVI-9 (Gh13), FAVI-12(Gh2) y FAVI-13(Gh17), provenientes de la Universidad Hebrea de Jerusalén, Israel, (HUJI), derivan su resistencia de la especie silvestre *Lycopersicon hirsutum*; observe figura 6. La línea seleccionada de la población segregante Pimper J-13 (Gpimper10), proveniente del INRA, Francia, deriva su resistencia de *Lycopersicon pimpinellifolium* y *Lycopersicon peruvianum*.

Las líneas seleccionadas de las líneas de mejoramiento TY-197, TY-198, provenientes del Centro Volcán, Israel, derivan su resistencia de *Lycopersicon peruvianum*.



**Figura 6.** Frutos de dos especies de tomate, *Lycopersicon esculentum* L. y *Lycopersicon hirsutum* L.

### 3.2.3 Información general de líneas susceptibles

Los cultivares susceptibles fueron seleccionados por sus características de rendimiento, firmeza del fruto y resistencia a otros patógenos, a continuación se mencionan las características más importantes (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Cultivares susceptibles a geminivirus pero portadores de otras características.

Cultivar	Origen y Características
Sun Coast	Carolina del Norte, fruto grande, Resistente a VF1 F2
Rodade	África del Sur, resistente a marchites bacteriana, VF1F2, tipo determinado.
Very Firm	Israel, larga vida de anaquel, VF1, tipo determinado.
M82	Israel, tipo de procesamiento, muy firme VF1.
HC7880	Cuba, crecimiento determinado, fruto firme tipo procesamiento, VFSM.

### 3.2.4 Material experimental utilizado

Los materiales que se describen en el cuadro 3, fueron los híbridos experimentales y comerciales evaluados.

**Cuadro 3.** Genotipos de tomate incluidos en la evaluación y su procedencia

Genotipo	Características	Fuente Resistencia	Institución mejoramiento
Llanero 1	Híbrido Experimental tolerante geminivirus.	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	FAUSAC / HUJI
TT02-2298	Híbrido Experimental tolerante _a Geminivirus	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	FAUSAC / HUJI
Elios	Híbrido Comercial Susceptible	-----	Peto Seed Co.
TT02-2301	Híbrido Experimental tolerante _a Geminivirus	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	FAUSAC / HUJI
Tara	Híbrido Comercial	-----	Seminis Vegetable Seeds
Silverado	Híbrido Comercial	-----	Seminis Vegetable Seeds

## **A. Descripción de los genotipos evaluados**

### **a. Elios.**

Uso industrial, madurez relativa o madurez en días desde la germinación es precoz (100 días). Tamaño de la planta es mediana a grande, habito de crecimiento determinado, tamaño o peso promedio de fruto 75 gramos, consistencia de la fruta grande, forma del fruto pera, primer corte de 70 a 75 días después del transplante, tolerancia y/o resistencia a *Verticillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, Bacterias y nematodos nodulares, rendimiento promedio/ manzana de 1300 cajas y rendimiento promedio de 50 TM/ha. (24).

### **b. Silverado.**

Uso industrial, madurez relativa o madurez en días desde la germinación 110 días (promedio), tamaño de la planta mediana, habito de crecimiento determinado vigoroso, tamaño o peso promedio de fruto 70-75 gramos, consistencia de la fruta es firme y uniforme, forma del fruto es pera, tolerancia y/o resistencia a *Verticillum*, *Fusarium*, sólidos promedio 4.8 y pH promedio 4.8 excelente unidad productora (17).

### **c. Tara.**

Es un híbrido del tipo saladatte, cuya característica principal es mantener frutos de tamaño después de varias cosechas. Su planta determinada tiene un vigor moderado, pero suficiente para cubrir muy bien sus frutos. Es resistente a Nematodos, *Fusarium* y Virus de Mosaico del Tabaco, su madurez alcanza 80 días después

del trasplante (17).

**d. Llanero 1.**

Este híbrido deriva su resistencia de una línea seleccionada en la unidad de riego de sansirisay a partir del híbrido experimental FAVI-9, obtenido de la Universidad Hebrea de Jerusalén, Israel (HUJI) donde este híbrido tiene como fuente de resistencia la especie silvestre *Licopersicon hirsutum*, donde como un intento para mejorar el rendimiento y la calidad del fruto la línea resistente denominada GF1) fue cruzada por un cultivar de origen cubano (HC-7880), susceptible a geminivirus pero con una alta productividad bajo condiciones tropicales de cultivo y frutos firme, (17).

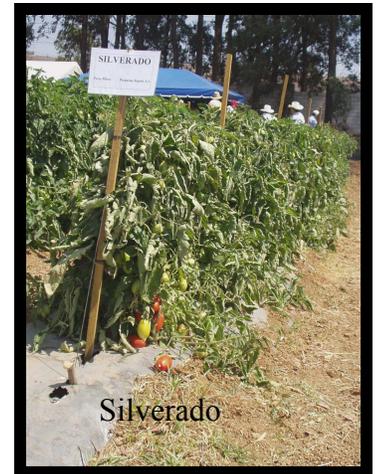
**e. TTO2-2301.**

Este híbrido fue producido mediante el cruce de la línea resistente Gh2, y una línea susceptible proveniente de la HUJI, también con buenas características de rendimiento y calidad (17).

**f. TTO2-2298**

Este híbrido fue producido mediante el cruce de la línea resistente Gh1, y una línea susceptible proveniente de la HUJI, también con buenas características de rendimiento y calidad (17).

En la figura 7 y 8 se presentan los híbridos comerciales y experimentales.



**Figura 7.** Híbridos comerciales Elios, Tara y Silverado.



**Figura 8.** Híbridos experimentales Llanero 1 y TT02-2298.

### 3.2.5 Fase de laboratorio

La extracción de ADN viral y la determinación de la concentración de ADN viral se utilizó el método de hibridación de ácidos nucleicos de las muestras, se realizó en el laboratorio de biotecnología Vegetal (B-12) del edificio T-8 de la Facultad de Agronomía, Ciudad Universitaria zona 12.

Laboratorio de biotecnología vegetal cuenta con iniciadores y sondas específicas para la detección de siete

geminivirus del tomate del Hemisferio Occidental: (16).

- Tomato severe leaf curl virus, ToSLCV (GT-1)
- Tomato golden mottle virus, ToGMoV (GT2)
- Pepper golden mosaic virus, PepGMV (GT-3)
- Tomato mild mottle virus, ToMiMoV (HN-1)
- Tomato mosaic Habana virus, ToMHV (HN-2)
- Tomato yellow mottle virus, ToyMov (CR-1)
- Tomato leaf curl Sinaloa virus, ToLCSinV (CR-2)

También se cuenta con iniciadores y sondas específicas para el geminivirus del Hemisferio Oriental, introducido en el Caribe

Se cuenta con iniciadores y sondas generales para la detección de Begomovirus del Hemisferio Occidental TYLCV(17).

### **3.2.6 Antecedentes de la investigación**

A. Identificación del virus en el cultivo del tomate en cinco departamentos de Guatemala.

Esta actividad se realizó con el fin de determinar la presencia o no de algunos virus de la enfermedad llamada “encrespamiento” del tomate y si es transmitida p no por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius), el muestreo se realizo en los siguientes departamentos: Zacapa, Jalapa, Jutiapa, Guatemala y Chimaltenango. En la cual se obtuvieron 51 muestras foliares en igual numero de plantas, las cuales fueron

analizadas mediante el método ELISA e hibridaciones y los virus encontrados fueron: Etch del tabaco (TbEV) 14 %, mosaico del tabaco (TMV) 20 %, mosaico del pepino (CMV) 20 %, X de la papa (PVX) 10 %, Y de la papa (PVY) 14 %, y de la mancha rustica del tomate (TSWV) 2 %. De las 51 muestras, 212 fueron utilizadas para identificar al geminivirus y en cual se encontró el virus del enrollamiento de la hoja del ayote (SCLV) 95 %, el virus chino del tomate (CdTV) 72 % y con una mezcla de 9 geminivirus (BMGB tipo pr y fl, TGMV, AbMV, CdTV, ACMV, TYLCV, ICMV, SLCV) el 53 %, resultado una muestra negativa para todos estos virus (22).

#### B. Virus géminis que infectan el tomate en Guatemala.

Mejía, al (15) en un proyecto dirigido hacia la búsqueda de soluciones de la problemática del complejo mosca blanca-geminivirus asociados al cultivo del tomate contempla entre sus objetivos la detección e identificación de los geminivirus presentes en la unidad de riego Sansirisay en Sanarate, Guatemala y su cuantificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Resultado de su investigación concluye que los virus asociados al cultivo del tomate en Guatemala pertenecen a la familia Geminiviridae, al género Begomovirus, con organización del genoma bipartita y monopartita, transmitidos exclusivamente por el vector mosca blanca y son de tres tipos diferentes, el virus del enrollamiento del tomate (ToSLCV), virus del moteado dorado del tomate (ToGMoV) y virus del mosaico dorado del pimiento (PepGMV). El PepGMV también fue detectado en muestras de chile y el ToSLCV en muestras de pepino. Se encontraron además los virus Huasteco y Sinaloa.

Mejía (15), en 1999, trabajó en la evaluación de genotipos de tomate resistentes al virus del enrollamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) y en genotipos de tomate adaptados a condiciones tropicales, obtenidos de diferentes programas de mejoramiento de tomate. Este trabajo consistió en evaluar los materiales sin ninguna protección química contra la mosca blanca vector de geminivirus.

Los genotipos TY 197, TY 198, 8933 y FAVI 9 fueron los que mayor rendimiento reportaron sin protección química, mientras que los demás materiales susceptibles reportaron un menor rendimiento con una diferencia de aproximadamente del 50 % menor, dichas observaciones fue la que genero la interrogante:

Como se comportarían estos materiales bajo condiciones comerciales de cultivo, ya que esto permitiría conocer su potencial y las características útiles que podrían aportar al programa de mejoramiento.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 GENERAL

Evaluar la resistencia de seis híbridos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) a geminivirus transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius).

### 4.2 ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Determinar la severidad de síntomas de virosis en los híbridos de tomate evaluados a los 30 y 60 días después del transplante.
- 4.2.2 Determinar la concentración de ADN viral en los híbridos de tomate evaluados a los 45 días después del transplante
- 4.2.3 Comparar el rendimiento de fruto fresco de los híbridos de tomate evaluados.

## **5. HIPÓTESIS**

Al menos un híbrido de tomate presentara diferencias en la severidad de síntomas de virosis transmitida por mosca blanca, concentración de ADN viral en la planta y rendimiento de peso de fruto fresco.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 FASE DE CAMPO**

#### **6.1.1 Semillero**

Esto se realizó bajo las normas estrictas de la empresa de Pilonos de Antigua para que todos los híbridos entren a competencia con los mismos manejos desde la siembra del semillero.

#### **6.1.2 Preparación del terreno**

El área experimental se preparó un mes antes del transplante realizando 1 pasada de arada y 2 de rastra, debido a que las condiciones del mismo que lo permitieron realizarlo.

#### **6.1.3 Transplante**

Se realizó a los 30 días después de haber entregado la semilla a la empresa pilonera y la colocación al campo definitivo. Inmediatamente después se aplicó dazomet a razón de dosis de 35 gramos por metro cuadrado.

#### **6.1.4 Control de malezas**

Para esta actividad se realizaron dos limpiezas manuales, la primera después del trasplante, y la segunda veinte días después de la primera limpieza. En algunos lugares se usó herbicida paraquat a dosis de 3 litros por hectárea.

#### **6.1.5 Fertilización**

Se realizaron tres aplicaciones de fertilizante, la primera aplicación se realizó a los 5 días, la segunda aplicación a los 22 días, usando una fórmula completa (15-15-15) a dosis de 3 quintales por manzana y la tercera aplicación a los 55 días usando nitrato de calcio y potasio a dosis de 4 quintales por manzana.

#### **6.1.6 Control fitosanitario**

Para el control de enfermedades fungosas se aplicaron los siguientes fungicidas: Metalaxil a razón de 2.5 kilogramos por hectárea, Clorotalonil con una dosis de 2 litros por hectárea, Dimetomorf + Mancozeb con dosis de 2.5 kilogramos por hectárea, Benomil con dosis de 1.5 kilogramos por hectárea, y Cymoxamil a razón de 2.5 kilogramos por hectárea.

Para el control de plagas se utilizaron los siguientes insecticidas, Carbofuran con dosis de 2 litros por hectárea, Indoxacarb con dosis de 150 gramos por hectárea, Bifentrina con dosis de 600 cc/Ha., Imidacloprid con dosis de 1 litro por hectárea, Dimetoato con dosis de 1.5 litros por hectárea.

### **6.1.7 Cosecha**

El corte de los frutos se dio aproximadamente a los 65 días después del transplante; y se recolecto el fruto por cada unidad experimental.

## **6.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **6.2.1 Descripción de Tratamientos**

Cada uno de los híbridos utilizados en la presente investigación represento un tratamiento. Entre los tratamientos se incluyó los híbridos comerciales Tara, Elios y Silverado que son los mas cultivados en dicha región.

Tratamiento 1 = Híbrido Elios

Tratamiento 2 = Híbrido Llanero 7

Tratamiento 3 = Híbrido 2301

Tratamiento 4 = Híbrido Silverado

Tratamiento 5 = Híbrido Llanero 1

Tratamiento 6 = Híbrido Tara

### **6.2.2 Diseño Experimental**

En el cuadro 15 se muestra la distribución de cada uno de los tratamientos los cuales fueron distribuidos bajo un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones

### 6.2.3 Unidad Experimental

La unidad experimental utilizada fue una parcela bruta de 25 m<sup>2</sup>. Cada parcela consistió de cinco surcos con 7 plantas cada uno, haciendo un total de 35 plantas. La distancia de siembra fue de 0.65 metro entre planta y 1.0 metro entre surco. Se dejó 0.65 metro entre cada uno de los tratamientos y 1.0 metro entre cada bloque. De esta manera se obtuvo un área total del experimento de 600 m<sup>2</sup>. Como parcela neta se utilizaron los tres surcos del centro a los que se les eliminaron las plantas en cada extremo, para evitar cualquier efecto de borde, representado esta un área de 11.1 m<sup>2</sup> (15 plantas).

### 6.2.4 Variables Respuesta

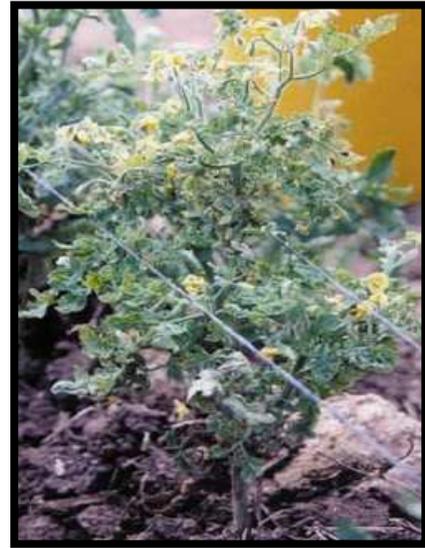
#### A. Índice de Severidad de virosis

Se realizaron dos lecturas de grado de severidad de síntomas de virosis, tomándose la primera a los 30 días después del transplante (30 DDT) y la segunda a los 60 días después del transplante (60 DDT). En el cuadro 4 se describe la escala de severidad que propone.

**Cuadro 4.** Escala de índice de severidad de virosis

Grado	Descripción
0	Ausencia de síntomas visibles.
1	Presencia de síntomas visibles solo por inspección cuidadosa.
2	Presencia de síntomas moderados en parte de la planta y visibles a corta distancia.
3	Síntomas moderados a severos en toda la planta pero con poco enanismo o achaparamiento.
4	Síntomas severos en toda la planta con mucho achaparamiento.

En la figura 9 se observa la escala de severidad de virosis.



**Figura 9.** Grado de severidad de la escala utilizada donde se observa una ausencia de síntomas visibles y la segunda síntomas severos en toda la planta y con mucho achaparramiento.

#### B. Concentración de ADN viral

Esta variable se midió por medio de la técnica de hibridación de ácidos nucleicos del ADN obtenido de las muestras tomadas en el tejido vegetal seco a los 45 días después del trasplante de los híbridos a evaluar, donde los datos se expresaron en forma de ng.

Para los resultados de respuesta de laboratorio se tomo la siguiente escala de clasificación.

- a. **0** = Resultado negativo (no existe presencia de virus en el material analizado).
- b. **1** = Resultado positivo (la hibridación indica que se encontró ante una muestra infectada por un tipo de virus).

### C. Rendimiento de fruto

Se tomaron con respecto a la parcela neta, cuando el fruto este apto para el corte en cada unidad experimental, siendo el momento de la cosecha y se expresaron el peso en kilogramos por planta.

#### 6.2.5 Análisis de la Información

Para las variables referentes índice de severidad a los 30 y 60 días después del trasplante, y concentración de ADN a los 45 días después del trasplante, se analizó con la prueba no paramétrica de Friedman para diseños en bloques aleatorizados.

Los datos obtenidos de la variable rendimiento, se realizó el análisis de varianza correspondiente a un experimento de bloques completos al Azar, cuyo modelo estadístico se presenta a continuación.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable respuesta asociada a la  $i,j$ -ésima unidad experimental (índice de Severidad y Rendimiento, concentración de ADN).

$\mu$  = Valor del efecto de la Media general.

$\alpha_i$  = Efecto de la  $i$  – ésima tratamiento.

$\beta_j$  = Efecto del  $j$  – ésimo bloque.

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental.

Se realizó una prueba de medias utilizando Tukey al 5 % de probabilidad. Además se realizó una comparación entre las concentración del virus versus el rendimiento a través del análisis de correlación para establecer el grado de asociación entre estas dos variables.

### **6.3 FASE DE LABORATORIO**

Se tomaron muestras a los 45 días después del trasplante de hojas, para el análisis de la concentración de ADN viral donde se utilizó 5 plantas de cada tratamiento que manifiesten síntomas, extrayendo el tejido vegetal aproximadamente 30 g. y llevadas al laboratorio.

#### **6.3.1 Extracción de ADN viral**

Para la extracción de ADN se utilizó el procedimiento por extracción con calor. Para luego utilizar la técnica de hibridación de ácidos nucleicos. Para la extracción con calor se utilizó este procedimiento.

- A. Se colocaron 10 mg de cada muestra en un micro tubo de 1.5 ml.
- B. Luego agregamos 250 ul de buffer de extracción (100 mM-Tris, HCl (ph 8.0), 50 mM-EDTA (ph 8.0), 500 mM-NaCl, 10 mM-B-mercaptoetanol.
- C. Se homogenizo el tejido con un pistilo (kontes) hasta que se suspendió en la solución.
- D. Se agregaron 250 ul de buffer de extracción a la muestra.
- E. Luego mezclamos fuertemente con agitador vortex.

- F. Lo llevamos a incubar a 96 grados centígrados durante 5 minutos.
- G. Luego se coloco sobre hielo durante 5 minutos.
- H. Posteriormente se Centrifugo a 10,000 x g por 10 minutos con el objetivo de sedimentar el resto de tejidos al fondo del micro tubo.
- I. El sobrenadante resultante se traslado a un micro tubo nuevo y se utilizo una alícuota de este sobrenadante en la hibridación de ácidos nucleicos.

### **6.3.2 Hibridación de Ácidos Nucleicos**

Para la detección de ADN viral, se realizó la hibridación de ácidos nucleicos usando una sonda general que se amplifico de la región de la cubierta proteica del virus por medio de la reacción en cadena de la polimerasa usando un par de iniciadores de PBGCTc647 y PBGGTc1048. En preparación de la sonda general etiquetada con la fosfatasa de álcali, se usó el kit de Alk PhosDirect nucleic acid labeling and detection system.

- A. Primero, se preparan 100 ng de producto de la reacción en cadena de la polimerasa en la cantidad final de 10 ul.
- B. Se incubó a 97 °C por 5 minutos para su desnaturalización.
- C. Se colocó sobre hielo por 5 minutos.
- D. Después de desnaturalizar se centrifugó brevemente y se agregaron las siguiente soluciones en este orden.
  - a. 10 ul de buffer de reacción
  - b. 2 ul de solución de labeling reagent

- c. 2 ul de solución crosslinker
- d. 8 ul de agua destilada
- E. Después de agregar todas las soluciones se incubó a 37 °C por 30 minutos (22).

### 6.3.3 Estimaciones de Concentración de ADN viral

Esta etapa se realizó en una membrana de nylon. Cada muestra de ADN extraído se diluyó en 1/1, 1/2, 1/4, , con agua destilada y 5 ul de esas muestras se colocaron sobre la membrana de nylon, procedimiento.

- A. La membrana de nylon se trató con 0.5 M-NaOH por 5 minutos; 1.0M-Tris.HCl (pH 7.4) por 5 minutos con agitación; 2 x SSC por 5 minutos con agitación; y 95 % etanol por 5 minutos con agitación.
- B. Después de secar bien la membrana de nylon a temperatura ambiente, las moléculas de ADN se fijaron fuertemente sobre la membrana de nylon, usando un horno UV-crosslinker.
- C. Durante las pruebas se usó un control negativo (Agua) y control positivo (un plasmido conteniendo ADN viral de concentración conocida).
- D. La membrana de nylon se incubó a 50 °C por 30 minutos en buffer de hibridación (0.5 M-NaCl, 4 % (w/v) y buffer de hibridación del kit, usando un horno de hibridación HB-2D (Techne).
- E. La sonda general etiquetada con la fosfatasa de álcali, se agregó al buffer de hibridación y se realizó la hibridación a 50 °C por 18 horas.
- F. Después de la hibridación, la membrana de nylon se lavó para eliminar el resto de sonda no hibridizada dos veces a 50 °C por 20 minutos con buffer del primer lavado (2.0 M-Urea, 0.1 %

(w/v)-SDS, 5<sup>a</sup> mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.0), 150 mM NaCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.2 % (W/V)) y dos veces a 22 °C por 10 minutos con buffer del segundo lavado (50mM-Tris.HCl (pH 10), 100 mM-NaCl y mM-MgCl<sub>2</sub>).

- G. La sonda se detectó por quimioluminiscencia, y las señales emitidas desde la reacción química sobre la membrana de nylon se detectaron en una película de rayos X kodak Xray dejándola expuesta por 4 horas.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 SEVERIDAD DE SÍNTOMAS DE VIROSIS

#### 7.1.1 Índice de Severidad a los 30 días después del trasplante

A los 30 días después del trasplante en campo definitivo se realizó la primera lectura de índice de severidad de síntomas de virosis, observándose en el en el cuadro 5 que se muestran las lecturas originales de cada uno de los tratamientos con sus repeticiones la cual indica el grado de severidad.

**Cuadro 5.** Datos originales para la prueba de Friedman para diseños en bloques completamente aleatorizados, para la variable del índice de severidad, monitoreado a los 30 días después del trasplante.

BLOQUES	TRATAMIENTOS					
	ELIOS	TT02-2298	TT02-2301	SILVERADO	LLANERO 1	TARA
<b>I</b>	1	1	0	1	0	1
<b>II</b>	1	1	0	2	0	3
<b>III</b>	1	0	0	1	0	3
<b>IV</b>	2	0	0	0	0	2

En la primera lectura de severidad se observó un comportamiento distinto en la evaluación visual de síntomas en cada uno de los híbridos tanto experimentales como comerciales, los cuales se pudo observar que los tratamientos Llanero 1 y TT02-2301 presentaron un grado de severidad cero (ausencia de síntomas visibles),

lo que nos llega a indicar que estos híbridos no tuvieron problemas de virosis en el estado fenológico de desarrollo vegetativo de la planta; mientras que los tratamientos Elios, TT02-2298, Silverado y Tara presentaron un grado de severidad uno, que indica que hubo presencia de síntomas visibles por inspección cuidadosa a moderada en parte de la planta y visible a corta distancia, esto demuestra que tampoco presentaron problemas en su desarrollo y se prepararon para la etapa de floración, siendo estos híbridos más sensibles a la infección de geminivirus.

Luego se procedió a realizar los cálculos, que se presentan en el cuadro 6, indica donde se llega a convertir las 24 observaciones a rangos, las que nos sirven para realizar la prueba de Friedman, la cual se maneja con un nivel de significancia del cinco por ciento.

**Cuadro 6.** Se presentan los rangos de las 24 observaciones para la variable índice de severidad de síntomas de virosis, a los treinta días después del transplante.

BLOQUES	TRATAMIENTOS					
	ELIOS	TT02-2298	TT02-2301	SILVERADO	LLANERO 1	TARA
I	1 (4.5)	1 (4.5)	0 (1.5)	1 (4.5)	0 (1.5)	1 (4.5)
II	1 (3.5)	1 (3.5)	0 (1.5)	2 (5.0)	0 (1.5)	3 (6.0)
III	1 (4.5)	0 (2.0)	0 (2.0)	1 (4.5)	0 (2.0)	3 (6.0)
IV	2 (5.5)	0 (2.5)	0 (2.5)	0 (2.5)	0 (2.5)	2 (5.5)
	18	12.5	7.5	16.5	7.5	22.0

La prueba de Friedman indica una región crítica de 11.070 con 5 grados de libertad.

El estadístico de prueba de Friedman da un valor de 12.35 con el cual rechazamos la hipótesis nula de que son idénticas las distribuciones del índice de severidad en los tratamientos y aceptamos la hipótesis

alternativas de que por lo menos dos híbridos tienen diferente comportamiento en las mediciones de las variables del índice de severidad de síntomas de virosis a los treinta días después del trasplante.

### 7.1.2 Índice de Severidad a los 60 días después del trasplante

A los 60 días después del trasplante en campo definitivo se realizó la segunda lectura de índice de severidad de síntomas de virosis, observándose en el cuadro 7 que se muestran las lecturas originales de cada uno de los tratamientos con sus repeticiones la cual indica el valor de grado de severidad.

**Cuadro 7.** Datos originales para la prueba de Friedman para diseños en bloques completamente aleatorizados, para la variable del índice de severidad, monitoreado a los 60 días después del trasplante.

BLOQUES	TRATAMIENTOS					
	ELIOS	TT02-2298	TT02-2301	SILVERADO	LLANERO 1	TARA
<b>I</b>	2	1	0	1	0	2
<b>II</b>	2	1	1	3	1	4
<b>III</b>	2	0	0	3	0	4
<b>IV</b>	2	0	1	1	0	2

Se realizó la segunda lectura de grado de severidad de síntomas de virosis, la cual nos mostró un comportamiento diferente en la evaluación visual de síntomas en cada uno de los híbridos evaluados, donde los tratamientos Llanero 1, TT02-2298, y TT02-2301 presentaron un grado de severidad cero y uno (ausencia de síntomas visibles y presencia de síntomas visibles solo por inspección cuidadosa). Mientras

que los demás tratamientos Elios, Silverado y Tara; presentaron un grado de severidad de dos y tres (presencia de síntomas moderados visibles a corta distancia, síntomas moderados a severos pero con poco enanismo).

Luego se procedió a realizar los cálculos, donde en el cuadro 8, se convierten las 24 observaciones a rangos, los nos sirven para realizar la prueba de Friedman, la cual se va a manejar con el nivel de significancia del cinco por ciento.

**Cuadro 8.** Se presentan los rangos de las 24 observaciones para la variable índice de severidad de síntomas de virosis, a los treinta días después del trasplante.

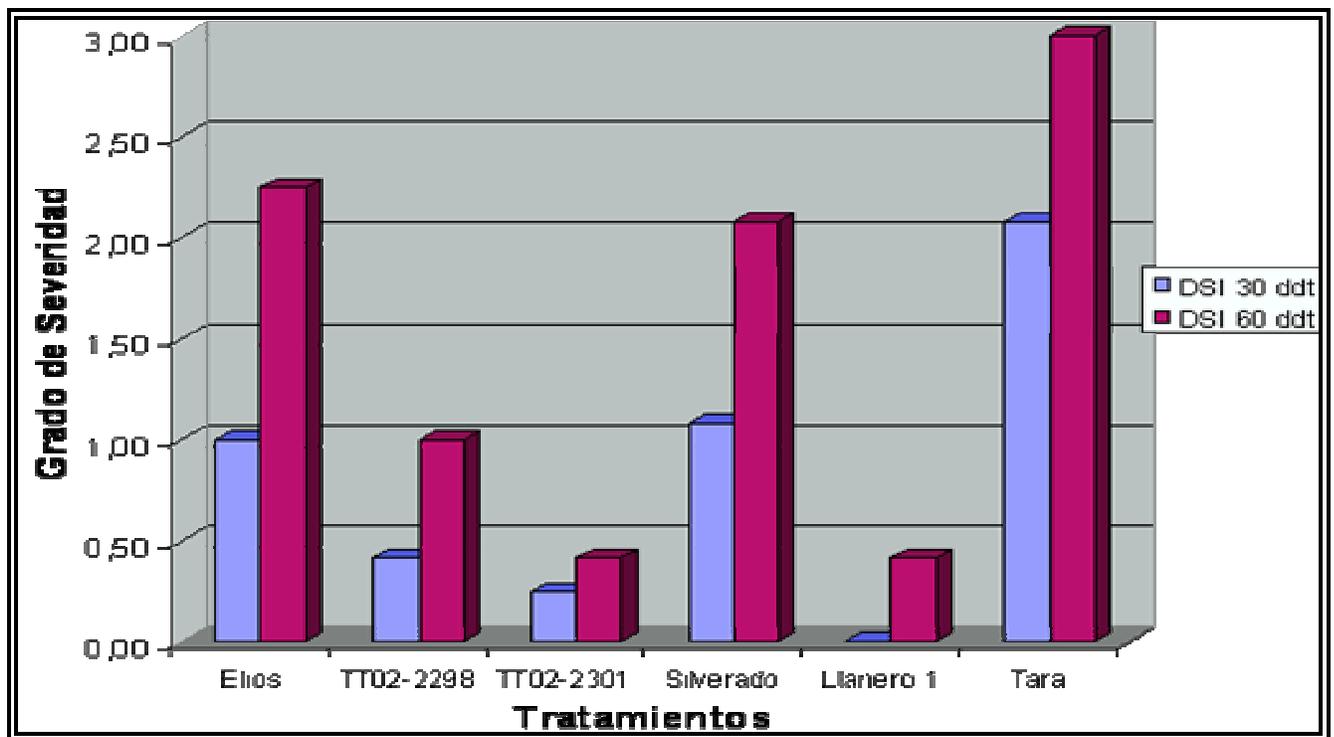
	TRATAMIENTOS					
BLOQUES	ELIOS	TT02-2298	TT02-2301	SILVERADO	LLANERO 1	TARA
I	2 (5.5)	1 (3.5)	0 (1.5)	1 (3.5)	0 (1.5)	2 (5.5)
II	2 (4.0)	1 (2.0)	1 (2.0)	3 (5.0)	1 (2.0)	4 (6.0)
III	2 (4.0)	0 (2.0)	0 (2.0)	3 (5.0)	0 (2.0)	4 (6.0)
IV	2 (5.5)	0 (1.5)	3 (3.5)	1 (3.5)	0 (1.5)	2 (5.5)
	19	9.0	9.0	17.0	7.0	23.0

La prueba de Friedman indica una región crítica de 11.070 con 5 grados de libertad.

El estadístico de prueba de Friedman da un valor de 15.28 con los cual rechazamos la hipótesis nula de que son idénticas las distribuciones del índice de severidad en los tratamientos y aceptamos la hipótesis alternativas de que por lo menos dos híbridos tienen diferente comportamiento en las mediciones de las variables del índice de severidad de síntomas de virosis a los sesenta días después del trasplante.

Como puede observarse en la figura 10, se pudo determinar que los híbridos experimentales presentaron los menores grados de severidad tanto a los 30 y 60 días después del transplante con un DSI igual y menor que uno, los cuales fueron los híbridos resistentes.

Hay que tomar en cuenta que el grado de severidad de síntomas en una escala de 0-4 a los 30 y 60 días después del transplante, en la cual menos de 2 es considerado indicativo de resistencia.



**Figura 10.** Grado de severidad de síntomas de virosis en los genotipos de tomate evaluados

## 7.2 CONCENTRACIÓN DE ADN VIRAL

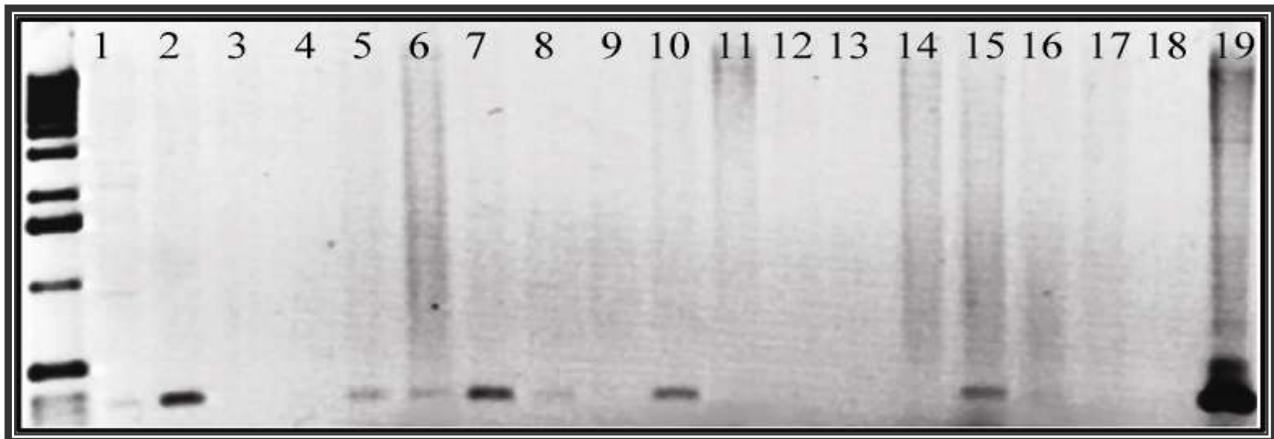
### 7.2.1 Amplificación de la Sonda

Para la realización de la hibridación ácidos nucleicos y así lograr la detección del ADN viral, se necesita un marcado previamente identificado llamado sonda general, en la cual las muestras analizadas solo se hibridarán con las secuencias específicas para las que son complementarias. Por tal razón en el cuadro 9 se identifica las muestras para la sonda de análisis de hibridación molecular y en la figura 11 se observan diferentes bandas de genomas la cual se utilizara para la identificación de geminivirus.

**Cuadro 9.** Identificación de las muestras analizadas en el laboratorio para el análisis de ADN viral.

Muestra	Código	Dilución	Bases	Cantidad	Resultado
0	Testigo				Positivo
1	T32-2	1	647 – 1048	401	Positivo
2	GT	-	647 – 1048	401	negativo
3	T32-2	1/100	647 – 1048	401	negativo
4	T32-2	1/1000	647 – 1048	401	negativo
5	9	1/1	647 – 1048	401	Positivo
6	9	1/100	647 – 1048	401	Positivo
7	GT	-	494 - 1048	554	Positivo
8	9	1/1000	647 – 1048	401	negativo
9	9	1	647 – 1048	401	negativo
10	GT	-	494 - 1048	554	Positivo
11	T32-2	1/100	494 - 1048	554	negativo
12	T32-2	1/1000	494 - 1048	554	negativo
13	9	1	494 - 1048	554	negativo
14	9	1/100	494 - 1048	554	negativo
15	GT	-	715 – 1978	1263	Positivo
16	T32-2	1	715 – 1978	1263	negativo
17	T32-2	1/100	715 – 1978	1263	negativo
18	T32-2	1/1000	715 – 1978	1263	negativo
19	Testigo				Positivo

En la figura 11, se muestran los resultados del proceso de amplificación de sonda de las diferentes muestras, la cual nos mostro diversos resultados, de los cuales las muestras 2, 7, 10 y 15, se hibridaron con las secuencias específicas para las que son complementarias, tomándose la sonda específica de la muestra número 15 siendo esta una GT la cual esta constituida por fragmento del genoma A de estos geminivirus.



**Figura 11.** Fotografía de gel, se observan bandas de 400 pares de bases genoma de un geminivirus.

### 7.2.2 Estimación de la Concentración, en diferentes disoluciones

Este método de detección y cuantificación del DNA viral se basó en la reacción de la cadena polimerasa con iniciadores generales y en la hibridación molecular con sonda marcada general. La hibridación de ácidos nucleicos se realizó sobre muestras fijadas en membranas de nitrocelulosa a las cuales se agregaron la sonda general, la cual es una secuencia de DNA viral clonado y marcado radiactivamente, la radioactividad fijada por las muestras positivas es detectada en las películas fotográficas después de la autorradiografía.

En los cuadros 10 y 11 se observan los valores estimados, y datos originales para la prueba de Friedman, de cada tratamiento, para la variable de concentración de ADN viral

**Cuadro 10.** Valores estimados de la concentración de ADN.

Muestra	TRATAMIENTO	Repetición	Resultado	10 mg de tejido seco
1	TT02-2298	IV	Negativo	0 ng
2	LLANERO 1	III	Negativo	0 ng
3	TT02-2301	III	Negativo	0 ng
4	TT02-2301	IV	Negativo	0 ng
5	TT02-2301	II	Negativo	0 ng
6	TT02-2301	I	Negativo	0 ng
7	TT02-2298	III	Negativo	0 ng
8	SILVERADO	IV	Positivo	100 ng
9	SILVERADO	III	Positivo	6.25 ng
10	SILVERADO	II	Positivo	6.25 ng
11	TARA	II	Positivo	6.25 ng
12	SILVERADO	I	Positivo	6.25 ng
13	LLANERO 1	II	Negativo	0 ng
14	TT02-2298	II	Negativo	0 ng
15	LLANERO 1	I	Negativo	0 ng
16	TT02-2298	I	Positivo	6.25 ng
17	ELIOS	IV	Positivo	50 ng
18	ELIOS	II	Positivo	50 ng
19	ELIOS	I	Positivo	75 ng
20	TARA	I	Positivo	6.25 ng
21	TARA	IV	Positivo	12.5 ng
22	TARA	III	Positivo	25 ng
23	LLANERO 1	IV	Negativo	0 ng
24	ELIOS	III	Positivo	50 ng
25	Control Positivo		Positivo	
26	Planta Sana		Negativo	

**Cuadro 11.** Datos originales para la prueba de Friedman para diseños en bloques completamente aleatorizados, para la variable de la concentración de ADN viral .

BLOQUES	TRATAMIENTOS					
	ELIOS	TT02-2298	TT02-2301	SILVERADO	LLANERO 1	TARA
I	1	1	0	1	0	1
II	1	0	0	1	0	1
III	1	0	0	1	0	1
IV	1	0	0	1	0	1

Luego se procedió a realizar los cálculos, donde en el cuadro 12, se convierte las 24 observaciones a rangos, las que nos sirven para realizar la prueba de Friedman, utilizando el nivel de significancia del cinco por ciento.

**Cuadro 12.** Se presentan los rangos de las 24 observaciones para la variable concentración de ADN viral.

BLOQUES	TRATAMIENTOS					
	ELIOS	TT02-2298	TT02-2301	SILVERADO	LLANERO 1	TARA
I	1 (4.5)	1 (4.5)	0 (1.5)	1 (4.5)	0 (1.5)	2 (4.5)
II	1 (5.0)	0 (2.0)	0 (2.0)	1 (5.0)	0 (2.0)	4 (5.0)
III	1 (5.0)	0 (2.0)	0 (2.0)	1 (5.0)	0 (2.0)	4 (5.0)
IV	1 (5.0)	0 (2.0)	0 (2.0)	1 (5.0)	0 (2.0)	2 (5.0)
	19.5	10.5	7.5	19.5	7.5	19.5

La prueba de Friedman indica una región crítica de 11.070 con 5 grados de libertad. El estadístico de prueba de Friedman da un valor de 13.39 con los cual rechazamos la hipótesis nula de que son idénticas las distribuciones del índice de severidad en los tratamientos y aceptamos la hipótesis alternativas de que por lo menos dos híbridos tienen diferente comportamiento en la mediciones de la concentración de ADN viral en las plantas de los distintos tratamientos evaluados.

En la figura 12 se observa el resultado del procedimiento de la detección de la señal quimioluminiscente se da cuando la fosfatasa alcalina, cataliza la descomposición de un sustrato (dioxetano). Esta descomposición emite una señal de luz que es detectada en una autoradiografía.



vegetales es indicativa de su capacidad de replicación en un genotipo determinado. En este caso, las muestras de los híbridos evaluados dieron la presencia de una señal positiva de hibridación, permite llegar al resultado que nos encontramos ante una muestra infectada por gen de virus.

### 7.3 RENDIMIENTO TOTAL

#### 7.3.1 Rendimiento por planta

En el rendimiento por planta de fruto de tomate de los híbridos evaluados en las cuatro repeticiones, después de 3 cortes, se observa en el cuadro 13.

**Cuadro 13.** Rendimiento por planta del fruto de tomate, de cada uno de los cultivares evaluados expresados en gramos.

TRATAMIENTOS	REPETICIÓN			
HÍBRIDOS	I	II	III	IV
ELIOS	298	140	435	525
TT02-2298	1350	1125	1435	1515
TT02-2301	2080	2168	1950	1340
SILVERADO	1550	1180	1850	1960
LLANERO 1	1740	1925	1460	1350
TARA	450	600	750	625

Los resultados obtenidos (cuadro 13), muestran el distinto comportamiento de los híbridos comerciales y

experimentales sobre el rendimiento de fruto expresado en gramos por planta, en la cual se observó cada una de las parcelas netas de cada repetición.

En cuadro 14, aparecen los resultados del análisis de varianza de la variable rendimiento por planta (gramos).

**Cuadro 14.** Análisis de varianza al 5 % de significancia para la variable rendimiento comercial por planta, expresada en gramos de los diferentes híbridos de tomate evaluados.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C.</b>	<b>C.M.</b>	<b>F.C.</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Tratamientos</b>	5	7691930.7083	1538386.1416	19.96	0.0001 *
<b>Error</b>	15	1156290.1249	77086.0083		
<b>Total</b>	23	8898352.9583			

Con base en el análisis de varianza efectuado a la variable de rendimiento por planta, se establece que existen diferencias significativas en rendimiento entre los cultivares evaluados al 5 % de significancia. El coeficiente de variación obtenido fue de 22 por ciento, se realizó una prueba de medias utilizando para el efecto el comparador de Tukey, utilizando el 5 % de significancia para la variable rendimiento por planta, la cual se observa en el cuadro 15.

**Cuadro 15.** Prueba de medias de Tukey al 5 % de significancia para la variable de rendimiento expresado en gramos por planta, en los diferentes cultivares evaluados.

<b>HÍBRIDOS</b>	<b>RENDIMIENTO</b>	<b>GRUPOS</b>
<b>TT02-2301</b>	1884.5	A
<b>SILVERADO</b>	1635.00	A
<b>LLANERO 1</b>	1618.8	A
<b>TT02-2298</b>	1356.3	A
<b>TARA</b>	606.3	B
<b>ELIOS</b>	349.5	B

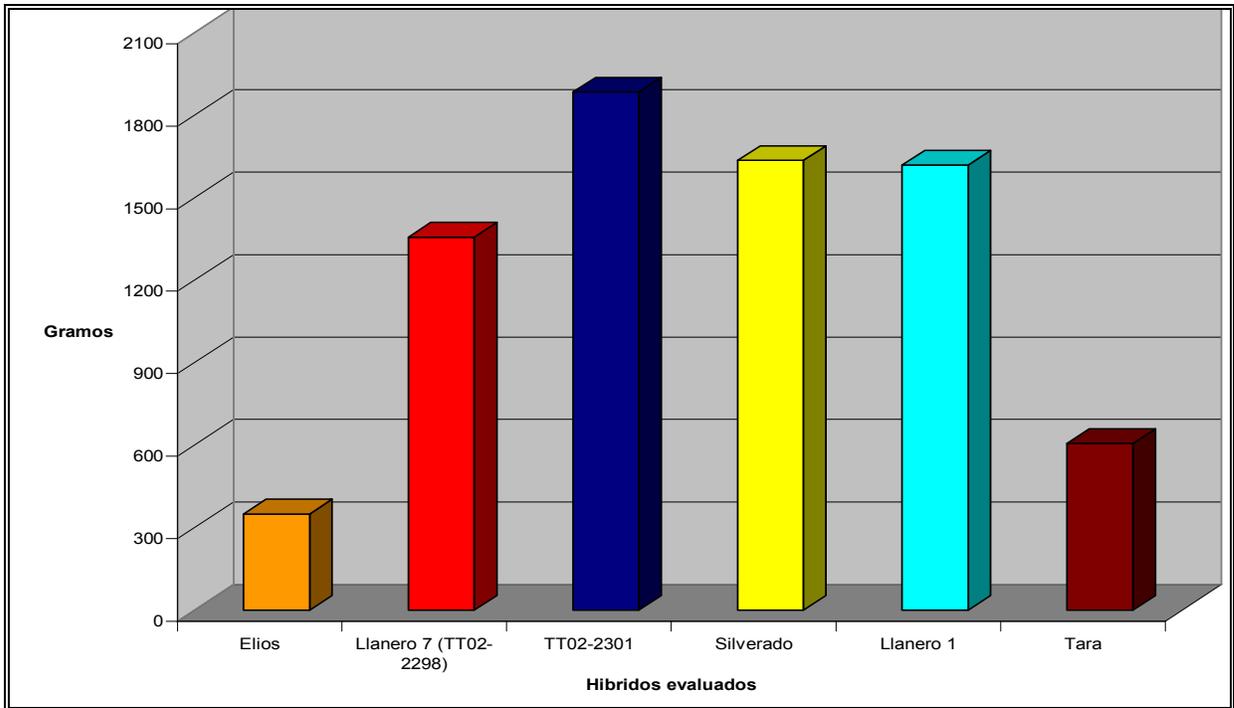
La prueba de Tukey muestra la conformación de dos grupos diferentes en la cual letras iguales indican que estadísticamente el rendimiento por planta es similar.

El primer grupo, literal A, lo forman cuatro híbridos de seis materiales evaluados, siendo estos los tratamientos TT02-2301 Silverado, Llanero 1 y TT02-2298, con rendimientos por planta que van de 1356.3 a 1884.5 y que estadísticamente son similares, donde el primer híbrido respectivamente presenta una mayor media en cuanto a rendimiento.

El segundo grupo de literal B, en el cual existen dos materiales, los rendimientos que presentan son estadísticamente similares, lo forman los híbridos Tara y Elios las cuales presentan las menores medias.

Al comparar agrupadamente las medias de rendimientos de los seis materiales evaluados, existe una marcada diferencia en cuanto a producción de gramos por plante de tomate, ya que los testigos de híbridos comerciales, Tara y Elios respectivamente, no superaron el alto rendimiento de los híbridos experimentales, excepto el híbrido Silverado.

La figura 13 muestra el rendimiento pro planta de los tratamientos evaluados, en la cual se pueden observar las diferencias que existen entre ellos.



**Figura 13.** Rendimiento por planta (gramos) de los híbridos experimentales y comerciales evaluados.

## 8. CONCLUSIONES

De los híbridos de tomate evaluados, estadísticamente presentaron la mayor resistencia a la virosis los materiales Llanero 1, TT02-2301 y TT02-2298; expresando un menor grado de índice de severidad, que los demás genotipos evaluados.

Se identificó al híbrido comercial Tara, con la mayor sensibilidad a la infección de la virosis, expresando el mayor índice de severidad.

Los híbridos comerciales mostraron un grado de severidad de síntomas a los 60 días después del trasplante mayor de 2 lo cual es considerado un indicativo de no resistencia a los geminivirus.

De las características cualitativas, la variable de estimación de la concentración de ADN viral en diferentes disoluciones, expresaron que los híbridos comerciales estaban infectados con geminivirus, las muestras extraídas de 10 mg de tejido seco.

El híbrido comercial Elios expresó la mayor concentración de ADN viral a diferentes disoluciones proporcionando valores arriba de 50 ng en todas sus repeticiones, extraídas de 10 mg de tejido seco.

Los híbridos con mayor rendimiento por planta son los siguientes: Llanero 1, TT02-2301, TT02-2298 y Silverado respecto a los otros cultivares evaluados.

Los híbridos Llanero 1 y TTT02-2301 presentaron un bajo índice de severidad, alto rendimiento, y una menor concentración de ADN viral en la planta.

## 9. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta evaluación, es necesario tomar en cuenta que los híbridos Llanero 1 y TTT02-2301 pueden ser utilizados en cruzamiento con otros genotipos, debido principalmente al alto potencial en rendimiento y resistencia a geminivirus.

Se recomienda realizar otras evaluaciones de híbridos de tomate en diferentes zonas de país, para llegar a obtener diferentes recomendaciones específicas para cada zona productora de tomate del país.

Es necesario, considerando los buenos resultados obtenidos de este trabajo, realizar otros cruces de híbridos de tomate, para encontrar un híbrido con todas las características de interés para los agricultores y consumidores.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña, W. 1993. Efecto de la infección de un geminivirus sobre el rendimiento del tomate en diferentes estados de desarrollo de la planta. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 30 p.
2. Bemisia; taxonomy, biology, damage, control and management. 1995. United Kingdom, Intercet. p. 357-367.
3. Calderon Bran, LF. 1997. El problema mosca blanca-virosis y métodos de control en tomate. Mexico, Limusa. 20 p.
4. Chavez Villalobos, MA. 1995. Generalidades de resistencia a insecticidas, formas de acción y pruebas para determinar toxicidad. 4 p.
5. Cruz, JR. De la. 1982. Clasificación de zonas de vida de Guatemala basado en el sistema Holdridge. Guatemala, Instituto Nacional Forestal. 42 p.
6. Dardon, D. *et al.* 1990. Identificación de virus en tomate en 5 departamentos de Guatemala. *In* Reunion Anual del Programa Coopeativo Centroamericano de Mejoramiento de Cultivos Alimenticios y Ganadería y Memorias (36., 1990, Guatemala). Memorias. Guatemala, ICTA. p 364-368.
7. Disagro, GT. 1996. Cultivo del tomate (en línea). Boletín Disagro (GT.) 4(1):1-8. Consultado 10 set. 2002. Disponible en <http://www.disagro.com/tomate/tomate5.htm>.
8. Depestre, T; Gomez, O. 1999. Mejoramiento de plantas. La Habana, Cuba, Instituto de Investigación Hortícola. p. 11-16.
9. Edmond, JB. *et al.* 1985. Principios de horticultura. Trad. por Federico Garza. México, Continental. 575 p.
10. Harrison, BD. 1985. Advances in geminivirus research. *Ann. Rev. Phitopathology.* 23:55-82.
11. INFOAGRO, ES. 2002. El cultivo del tomate; continuación del apartado 7.1.2 (en línea). España. Consultado 10 oct. 2003. Disponible en <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate5.asp>
12. Lastra, R. 1992. Los geminivirus: un grupo de fitovirus con características especiales. *In* Taller Centroamericano y del Caribe (1992, Turrialba, Costa Rica). Memoria; las moscas blancas (homóptera: aleyroridae) en América Central y el Caribe. Ed. por Luko Hilje y Orlando Arboleda. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 16-19.
13. Lacer, G; López, M; Trapero, A; Bello, A. 2000. Patología vegetal. 2 ed. España, Omega. tomo 1.
14. Maxwell, FÑ; Jennings, P. 1991. Mejoramiento plantas resistentes insectos. México, Limusa. 696 p.

15. Mejia, L. 1999. Evaluación de genotipos de tomate para resistencia a virus géminis transmitidos por mosca blanca y su detección por PCR. Informe Final. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 52 p.
16. \_\_\_\_\_. 2001. Mejoramiento genético del tomate para resistencia a geminivirus. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 41 p.
17. \_\_\_\_\_. 2001. Mosca blanca; resistencia genética en el tomate, a la virosis transmitida por la mosca blanca. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. p. 2-3 .
18. \_\_\_\_\_. 2002. Híbridos resistentes a virosis transmitida por mosca blanca y a otros patógenos de importancia económica para la producción sostenible de tomate en Guatemala. Guatemala, AGROCYT. 27 p.
19. Nuez, F. 1999. El cultivo de tomate. 2 ed. España, Mundi Prensa. 320 p.
20. Polston, JE; Anderson, PK. 2002. Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por mosca blanca en tomate en el hemisferio occidental. Manejo Integrado de Plagas (CR) no. 64:10-13.
21. Roberto D.; Calderon, L; Morales, J. 1992. Manejo integrado de plagas en tomate. Guatemala, MIP / ICTA / CARRE / ARF. p. 113-123.
22. Salguero, V. 1992. Perspectivas para el manejo del complejo mosca blanca-virosis. *In* Taller Centroamericano y del Caribe (1992, Turrialba, Costa Rica). Memoria: las moscas blancas (homóptera: aleyrodidae) en América Central y el Caribe. Ed. por Luko Hilje y Orlando Arboleda. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 20-26.
23. Villa Real, R. 1982. Tomates. San José, Costa Rica, IICA. 184 p.
24. Villela Ramirez, JD. 1993. El cultivo del tomate. Guatemala, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Proyecto de Desarrollo Agrícola. 144 p.

## 11. APENDICES

**Cuadro 16.** Distribución de cada parcela, con su respectivo tratamiento en cada uno de los bloques.

REPETICIONES			
I	II	III	IV
1	4	3	2
2	6	5	4
3	1	4	6
4	5	2	1
5	2	6	3
6	3	1	5

Tratamiento 1 = Híbrido Elios

Tratamiento 2 = Híbrido TT02-2298

Tratamiento 3 = Híbrido TT02-2301

Tratamiento 4 = Híbrido Silverado

Tratamiento 5 = Híbrido Llanero 1

Tratamiento 6 = Híbrido Tara

**Cuadro 17.** Grado de severidad de síntomas de virosis en los híbridos de tomate evaluados.

HÍBRIDOS	REPETICIÓN							
	I		II		III		IV	
	30 DDT	60 DDT	30 DDT	60 DDT	30 DDT	60 DDT	30 DDT	60 DDT
ELIOS	1.0	2.0	1.0	2.0	0.0	1.0	1.0	2.0
	1.0	2.0	0.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0
	1.0	3.0	2.0	3.0	1.0	3.0	3.0	4.0
TT02-2298	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0
	1.0	3.0	2.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TT02-2301	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	1.0
	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0
SILVERADO	0.0	1.0	2.0	3.0	1.0	3.0	0.0	1.0
	2.0	3.0	3.0	4.0	1.0	2.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	1.0	3.0	2.0	4.0	1.0	1.0
LLANERO 1	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	1.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	1.0
TARA	1.0	2.0	3.0	3.0	4.0	4.0	1.0	2.0
	0.0	2.0	4.0	4.0	3.0	4.0	0.0	2.0
	1.0	1.0	2.0	4.0	3.0	4.0	3.0	4.0

En el cuadro 18, se encuentra la escala propuesta para evaluar el acolochamiento del tomate, el cual contiene la información a un puntaje, para su evaluación respectiva.

**Cuadro 18.** Escala propuesta de Índice de Severidad (DSI) de síntomas de virosis en los híbridos de tomate evaluados.

Puntaje	Severidad
0	Sin síntomas
1	“Creo que tiene” síntomas
2	Síntomas ligeros
3	Síntomas moderados
4	Plantas extremadamente achaparradas, hojas deformes

En el desarrollo de esta fase se empleó la prueba de Shaphiro-Wilks, para evaluar el supuesto de normalidad de que los residuos se distribuyen normalmente. Así mismo se aplicó la prueba de Bartlett para evaluar el supuesto de homogeneidad de varianzas.

Para verificar el supuesto de normalidad en la prueba de Shaphiro-Wilks, se presentó una probabilidad para cada una de las variables a evaluar.

- Severidad de 30 días después del transplante de ( $Pr < W = 0.6910$ ).
- Severidad de 60 días después del transplante de ( $Pr < W = 0.4625$ ).
- Variable de Rendimiento de ( $Pr < W = 0.6833$ ).

Lo cual brinda suficiente evidencia estadística que nos indica que las tres variables a evaluar, el comportamiento de los residuos, se distribuye normalmente.

En el caso de la homogeneidad de varianzas en la prueba de Bartlett, presentó las siguientes probabilidades.

- Severidad de 30 días de ( $\alpha=0.5122$ ).
- Severidad de 60 días de ( $\alpha=0.1095$ ).
- Variable de Rendimiento nos dio ( $\alpha=0.1095$ ).

Las cuales son mayores a 0.05 con lo cual se estableció que no existe homogeneidad de varianzas.