

PEST MANAGEMENT

Transmisión del Tomato Venezuela Virus por *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), en Maracaibo, Venezuela

GUSTAVO ROMAY¹, FRANCIS GERAUD-POUEY², DORYS T CHIRINOS², FRANCISCO MORALES³, EMILIO HERRERA², CARLOS FERNÁNDEZ², ANA K MARTÍNEZ³

¹Lab. de Biotecnología Vegetal, Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Apartado 17606, Parque Central, Caracas 1015A, Venezuela; gromay@idea.gob.ve; ²Unidad Técnica Fitosanitaria, Facultad de Agronomía, La Univ. del Zulia, Maracaibo ZU 4005, Venezuela; ³Unidad de Investigaciones en Virología, CIAT, Palmira, Colombia

Edited by Herbert Siqueira – UFRPE

Neotropical Entomology 39(2):266-274 (2010)

Transmission of Tomato Venezuela Virus by *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), in Maracaibo, Venezuela

ABSTRACT - The biological transmission of Tomato Venezuela virus (ToVEV) by biotype B of the whitefly species *Bemisia tabaci* (Gennadius) increased (21.7-95.0%), and the time for symptom expression decreased (16-12.6 days) as the number of viruliferous whiteflies allowed access for inoculation to susceptible tomato plants increased from 1 to 20 adults/plant. When acquired only as a nymph, adults of this biotype transmitted the virus to 88.3% of susceptible tomato plants, using 15 viruliferous individuals per test plant, corroborating the circulative nature of the transmission. Disease incidence further increased (up to 100%) when the individuals were allowed to feed again on a virus-infected plant as adults. Leaf area, plant height and dry matter were significantly affected in ToVEV infected tomato plants.

KEY WORDS: *Begomovirus*, Geminiviridae, tobacco whitefly

Los problemas fitosanitarios han afectado por muchos años la producción de tomate en Venezuela, especialmente los artrópodos plagas (Geraud *et al* 1995) y enfermedades virales (Debrot *et al* 1963, Lastra & Uzcátegui 1975, Nava *et al* 1996, 2006). En 1990 se observó una deformación foliar ('encrespado') y amarillamiento en plantaciones de tomate localizadas en las márgenes del río Limón, al noroeste del estado Zulia. El origen de estas plantas enfermas fue aparentemente semilleros del Valle de Quibor, estado Lara; una zona agrícola endémicamente afectada por varias plagas y enfermedades. Los síntomas avanzados de esta afección se caracterizan por encrespados con ligeras variegaciones cloróticas de los brotes foliares. Los folíolos se deforman longitudinalmente hacia abajo o hacia los lados, o se enrollan hacia arriba en el sentido longitudinal, reduciéndose considerablemente su área foliar. Los entrenudos y raquis de las hojas se acortan y con frecuencia se engruesan y tuercen, resultando en el enanismo y deformación foliar de la planta. Estos síntomas restringen el desarrollo normal de la planta y reduce significativamente su rendimiento. Esta sintomatología difería considerablemente de las acentuadas variegaciones cloróticas causada por el Tomato yellow mosaic virus (ToYMV), afección común en la región central y centro occidental del país (Debrot *et al* 1963, Lastra & Uzcátegui 1975).

Esta enfermedad continuó observándose en las plantaciones de tomate en la misma zona, pero con una

incidencia que no comprometía seriamente la producción. No obstante, durante el ciclo de cultivo octubre 1997- abril 1998, se desarrolló una fuerte epifitía que afectó severamente la mayoría de los sembradíos de tomate de esta zona (unas 400 ha), coincidiendo con altas poblaciones de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius). La proporción de plantas enfermas aumentó a medida que avanzaba el período de producción, especialmente cuando se establecían sembradíos contiguos, escalonados en el tiempo. Los sembradíos provenientes de semilleros sembrados a plena exposición, cercanos a campos infectados, mostraron mayor y más temprana incidencia de la enfermedad.

Hasta mediados de la década de los ochenta, en Venezuela el único *Begomovirus* reportado era el ToYMV (Debrot *et al* 1963, Lastra & Uzcátegui 1975). Este *Begomovirus* fue originalmente descrito sobre tomate (Debrot *et al* 1963, Lastra & Uzcátegui 1975) y eventualmente fue encontrado en algunas plantas de papa contiguas a campos de tomate altamente infectados (Debrot & Centeno 1985). Ya Debrot (1981) en un taller sobre enfermedades transmitidas por moscas blancas, celebrado en Oxford, Inglaterra, había informado de la infección de plantas de papa por el ToYMV, en Venezuela. A pesar de ello, en 1986 se aisló el ToYMV a partir de una planta de papa, proveniente de Venezuela, señalándolo como nuevo *Begomovirus* bajo el nombre de *Potato yellow mosaic virus* (PYMV) (Roberts *et al* 1986)

y su secuencia completa fue reportada posteriormente (Coutts *et al* 1991) quedando como referencia para este virus. Sin embargo, basados en el análisis de la secuencia de un fragmento de 1698 pb obtenido a partir de muestras de plantas de tomate infectadas por el ToYMV, preservadas en seco y refrigeradas desde principios de la década de 1980 en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) Caracas, Venezuela, Morales *et al* (2001) demostraron que el PYMV era una sinonimia del ToYMV debido a que estas tenían más de 95% de identidad en la secuencia de nucleótidos comparada.

Desde el primer reporte de este virus en papa, era evidente que se trataba de una relación virus-hospedero un tanto fortuita, en gran parte sujeta a la proximidad de campos de tomate infectados por este virus, corroborado esto por la baja eficiencia de transmisión por *B. tabaci* de papa a tomate y viceversa, contrastando con la alta transmisión de tomate a tomate, además de reproducir síntomas característicos en plantas indicadoras de ToYMV, entre otras pruebas biológicas (Debrot & Centeno 1985). Obviamente, ello no pudo haber sido percibido por Roberts *et al* (1986) puesto que no conocieron directamente la situación en campos venezolanos. Hasta donde conocemos, esa situación no ha sufrido cambios apreciables, mientras que en tomate han ocurrido severas epifitias con síntomas de mosaicos amarillos en diferentes regiones del país (Geraud-Pouey *et al* 1995).

Posteriormente, Guzmán *et al* (1997) caracterizaron parcialmente un nuevo *Begomovirus* en campos de tomate de los estados Aragua, Guárico y Monagas, cuya accesión en GeneBank es la No. AF026464 bajo el nombre Venezuela tomato geminivirus. Mencionando dicho número de accesión, este virus fue luego denominado como ToVEV por Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano (2001), lo cual se supone significa Tomato Venezuela virus, con el fin de adaptarlo a las reglas de nomenclatura propuestas por Fauquet *et al* (2000) para los geminivirus, las cuales obviamente no existían cuando fue reportado este virus por Guzmán *et al* (1997). Dada las similitudes en genomas, circunstancialmente aquí adoptamos el nombre de Tomato Venezuela virus para nuestro aislado. Nuevos *Begomovirus* han sido detectados en la zona andina venezolana (Nava *et al* 2006). Recientemente, fue encontrado también el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) como primer reporte para Venezuela, incluso para Sudamérica (Zambrano *et al* 2007).

Dado el impacto que han tenido estas afecciones virales en Venezuela y su insecto vector en los últimos años, en este trabajo fueron conducidos estudios de caracterización molecular, transmisión mediada por *B. tabaci*, así como el efecto sobre las plantas de tomates del Tomato Venezuela virus, para el cual usaremos el acrónimo ToVEV asignado por Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano (2001).

Material y Métodos

El presente trabajo fue realizado en condiciones de laboratorio [temperatura (T): $26,74 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa (HR) 75%; aproximadamente 12h: 12h, fotofase: escotofase, sin excluir luz natural] combinado con jaulas-umbráculos, en el exterior del laboratorio, (T: $29,6 \pm 4,0^{\circ}\text{C}$

y HR: 87%) en la Unidad Técnica Fitosanitaria, Facultad de Agronomía, La Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela, durante el período mayo-agosto de 2000. Tanto el agente causal del encrespado de la hoja del tomate, como el insecto vector, *B. tabaci*, provenían de la zona del río Limón, al noroeste del estado Zulia, Venezuela. Los diagnósticos moleculares fueron realizados en la Unidad de Investigación en Virología, CIAT, Palmira, Colombia (año 2001), así como, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal IDEA, Sartenejas, estado Miranda, Venezuela (año 2007-2009).

Producción de plantas sanas. Plantas de tomate híbrido 'Río Orinoco' (Petoseed, Saticoy, California, EE.UU.) fueron utilizadas para mantener colonias del insecto vector libre de virus, así como para los ensayos de transmisión. Las semillas fueron sembradas en bandejas iniciadoras de polietileno (52 x 62 cm con 200 receptáculos), sobre sustrato a base de turba de musgo (Sunshine Plug Mix 5, Sun Gro Horticulture Inc. Bellevue, Washinton, EE.UU.) y mantenidas dentro del laboratorio. Una vez germinadas las semillas, las bandejas fueron transferidas a jaula-umbráculo (2,3 m x 1,12 m x 1m; largo x ancho x alto; cubierta con malla de nylon de 16 x 10 hilos/cm) al aire libre, colocadas sobre mesones en el exterior del laboratorio. Después de un mes de sembradas las plantas fueron transplantadas en materos plásticos (capacidad: 1 L), utilizando una mezcla de dos partes de suelo franco-arenoso y una parte de materia orgánica vegetal descompuesta, previamente esterilizada en autoclave. Los trasplantes fueron realizados dentro del laboratorio para evitar riesgos de transmisión de cualquier virus por insecto. Seguidamente las plantas fueron regresadas a la jaula-umbráculo.

Plantas fuentes del virus. Plantas de tomate ($n = 6$) de aproximadamente de 2,5 meses de edad con marcados síntomas del encrespado amarillento, fueron colectadas en sembradíos de las márgenes del río Limón (19-III-98), transplantadas a materos (capacidad: 3 l) y mantenidas dentro de una jaula-umbráculos. A partir de allí, nuevas plantas sanas, fueron periódicamente transferidas a la jaula, para infectarlas mediante la transmisión por adultos de *B. tabaci* criándose sobre las plantas enfermas. Dichas plantas fueron utilizadas como fuente del agente causal del encrespado amarillento del tomate.

Para determinar la identidad del virus, en el año 2001 fueron analizadas muestras de ápices foliares de plantas de tomate sintomáticas, preservadas desde la transmisión experimental por *B. tabaci*. A dichas muestras foliares se les extrajo el ADN y se procedió a su amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores AV494 y AC1048 para el fragmento de 550 pares de bases (pb) de la región central del gen que codifica la cubierta proteica (CP) del virus, diseñados por Wyatt & Brown (1996). Los productos de PCR se clonaron en el plásmido pCR 2.1 (Invitrogen) y sus secuencias se determinaron en un instrumento automático ABI PRISM 377XL (Perkin Elmer). La comparación de secuencias parciales con las disponibles para otros begomovirus previamente caracterizados (GeneBank) se realizó usando la función de similitud de secuencias BLAST. En julio 2007, con el fin de avanzar en la caracterización molecular de este virus,

duplicados de las mismas muestras secas y guardadas en el congelador (-10°C) desde el año 2000, fueron usadas para volver a amplificar y secuenciar directamente el fragmento del ADN viral de 550 pb (Wyatt & Brown 1996), así como un fragmento de 1100 pb con los iniciadores AV1978-AC496. Éstos amplifican la región común y parte de las secuencias de AC1 (replicasa) y AV1 (CP) del virus (Rojas *et al* 1993). En el 2009, fue amplificado otro fragmento de 1300 pb, usando los iniciadores AV1978-AC715 (Rojas *et al* 1993). Este último fragmento de 1300 pb junto al fragmento de 550 pb, fueron ensamblados usando el programa DNAMAN (versión 5.0; Lynnon BioSoft, Quebec, Canadá). Esta secuencia fue alineada y comparada con el PYMV o ToYMV descrito por Coutts *et al* (1991) y un aislado del ToYMV proveniente del Valle del Cauca, Colombia (Martínez 2008) (N° de acceso en GeneBank: EU518935), mediante el método de alineamiento óptimo incluido en el programa DNAMAN.

Colonia de *B. tabaci* libre de virus. Plantas sanas de tomate de aproximadamente 1,5 meses de edad (con 3-4 hojas verdaderas) fueron expuestas dentro de una jaula entomológica de madera (0,53 m x 0,53 m x 0,53 m, largo x ancho x alto), a adultos de *B. tabaci*, provenientes de hojas de melón (*Cucumis melo*), colectadas en la zona del río Limón, municipio Páez, estado Zulia (12-VII-1999). Posteriormente, para asegurar la ausencia de agentes virales (síntomas), adultos provenientes de la colonia fueron colocados sobre 20 plantas sanas de tomate (20-30 individuos/planta), manteniendo en observación las plantas por 30 días. A lo largo del estudio, el proceso se repitió tres veces con seis, tres y cuatro plantas respectivamente, hasta asegurar la ausencia de cualquier síntoma viral, constituyendo así la colonia base. Adultos de esta colonia fueron transferidos a una jaula-umbráculo en el exterior del laboratorio, con mayor número de plantas sanas (6-10) para utilizarla como colonia de respaldo. Esta colonia se ha mantenido ininterrumpidamente desde sus inicios.

Debido al efecto determinante del biotipo de *B. tabaci* en las relaciones virus-vector-planta (Bedford *et al* 1994), individuos provenientes de la colonia fueron colectados en enero del 2004 para su caracterización molecular y comparación con individuos del biotipo B y A gentilmente facilitados por la Dra. Judith Brown de la Universidad de Arizona, EE.UU., mediante secuencias microsatélites desarrolladas por De Barro *et al* (2003), así como Tsagkarakou & Roditakis (2003). Con ayuda del programa Microsatellite Tools (Park 2001), los individuos de la colonia libre de virus (n = 6) fueron comparados con los controles de los biotipos A y B (n=6 para cada biotipo) mediante los algoritmos desarrollados por Bowcock *et al* (1994) para el cálculo de la distancia entre genotipos, basado en la presencia de alelos comunes.

Procedimientos básicos en la transmisión del virus por *B. tabaci*. Los experimentos de transmisión fueron realizados con adultos \leq 48h de emergidos. Para cada experimento, cuatro plantas de la colonia libre de enfermedades fueron transferidas a una jaula entomológica dentro del laboratorio, previamente desinfectada con hipoclorito de sodio al 10%. Los adultos existentes sobre las plantas habían sido eliminados aplicando propargite (Omite 6-E, Uniroyal Inc. Naugatuck,

CT, EE.UU., dosis de 0,072% i.a. p/v). Pasadas las 48h, los nuevos adultos emergidos fueron colectados con un succionador de boca, para luego ser utilizados como vectores. Ramas terminales, de unos 15 cm de longitud, con marcados síntomas del encrespado amarillento fueron cortadas de plantas enfermas para ser utilizadas como fuentes del agente causal, introduciendo su tallo en un envase con agua, a través de una lámina de poliestireno (15 cm x 15 cm x 2 cm) perforada en el centro, sobre la cual se colocó una jaula cilíndrica de plástico transparente (sección de envase de gaseosa de 2 L, 10 cm x 15 cm, diámetro x altura) con el tope cerrado con organza. Los adultos de *B. tabaci* fueron introducidos dentro de la jaula, colocando el tubo de vidrio del succionador con el cual habían sido colectados, destapados boca arriba.

Efecto del número de adultos sobre la transmisión del virus. Después de un período de acceso-adquisición de 24h, los adultos de *B. tabaci* fueron transferidos a plantas sanas en número de 1, 5, 10, 15, y 20 adultos/planta por un período de acceso para inoculación de 72h. Después del período de inoculación, las plantas fueron asperjadas con clorpirifos (Lorsban, Dow Chemical, MI, EE.UU.) con el fin de matar las moscas blancas y luego fueron transferidas a las jaulas-umbráculo, para la diaria observación de aparición de síntomas (encrespado de los nuevos brotes) durante los siguientes 30 días. La unidad experimental consistió de diez plantas/repeticiones y se hicieron dos repeticiones. En cada repetición se incluyó un testigo no expuesto al insecto consistente de igual número de plantas. Los porcentajes de infección fueron estimados con el número de plantas que manifestaron los síntomas de la enfermedad en relación con el total de plantas evaluadas diariamente dentro de cada tratamiento.

Adquisición del virus por *B. tabaci* como ninfa y transmisión como adulto. Con la finalidad de evaluar la transmisión del virus por adultos de *B. tabaci*, cuando la adquisición ocurrió solamente durante el desarrollo ninfal, ninfas de final de cuarto estadio, criadas sobre plantas con síntomas de virus, fueron separadas de las hojas, utilizando un pincel fino y posteriormente transferidas a capsulas Petri de plástico transparente (5 x 1 cm, diámetro x altura). Los adultos de allí emergidos fueron colocados sobre plantas sanas (15 adultos/planta), permitiendo 96h como tiempo de acceso para inoculación; período mayor al usado en el ensayo de eficiencia de transmisión para adultos obtenidos de crías en plantas sanas (72h). Este tiempo de acceso se aumentó dado que para otro *Begomovirus* se ha reportado menor posibilidad de transmisión cuando la adquisición ocurre solo durante la fase ninfal, con un máximo de 36%, para 10 individuos por planta y 48h de tiempo de acceso para inoculación (Mehta *et al* 1994). Simultáneamente, adultos también provenientes de ninfas criadas sobre plantas con el virus, fueron transferidos por un período de acceso para adquisición de 24h sobre ramas de plantas fuentes, y luego transferidos a plantas sanas (15 adultos/planta) por un período de acceso para inoculación de 72h (adquisición cuando ninfa y adulto). Los resultados fueron comparados con los obtenidos con 15 adultos/planta, en el experimento para evaluar el efecto del número de adultos en la eficiencia de transmisión (adquisición solo cuando adulto).

Efecto de la enfermedad sobre el crecimiento de las plantas.

Con el fin de documentar el efecto del virus sobre el desarrollo de la planta de tomate, se determinó altura (cm), área foliar (cm²) y peso total de la planta (g), al mes del transplante (cerca de dos meses de la germinación) en cinco plantas sintomáticas (un mes después de expuestas para inoculación de ToVEV por 15 adultos/planta de *B. tabaci*) y cinco plantas no expuestas a *B. tabaci*, todas provenientes del ensayo de transmisión. La altura de las plantas fue medida con una cinta métrica. El área foliar se midió con un sistema analizador de imágenes (MK2, Delta-T Devices LTC, Londres, Inglaterra). Para determinar materia seca, las plantas fueron secadas en estufa a 70°C por 48h posterior a lo cual fueron pesada en una balanza con dos decimales de sensibilidad.

Análisis de resultados. En el caso del tiempo para aparición de síntomas, se utilizó un diseño factorial (cinco tratamientos x dos repeticiones x No. de plantas) analizado con el Modelo Lineal General (GLM) cuyas comparaciones de medias fueron hechas con la prueba de Mínimos Cuadrados ($P < 0,01$). El porcentaje de plantas sintomáticas, altura de plantas, área foliar y peso fueron analizados con un diseño completamente al azar y las comparaciones de medias hechas con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Adicionalmente, se realizó un análisis de regresión lineal entre el porcentaje de plantas con síntomas virales y el tiempo de aparición de síntomas de acuerdo al número de insectos utilizados para la transmisión. Estos análisis fueron realizados utilizando el programa del SAS Institute Inc. (1996).

Resultados y Discusión

Identidad del virus. En el 2001, las muestras tomadas de plantas de tomate sintomáticas en los ensayos de transmisión resultaron positivas a *Begomovirus*; cuya secuencia mostró 95% de identidad con relación al ToYMV para el fragmento de 550 pb correspondiente a la región central del gen de la proteína de la cápside, el cual es reportado como un marcador molecular de gran utilidad para la identificación y clasificación de begomovirus, especialmente cuando el porcentaje de similitud supera el 91% (Brown *et al* 2001).

Sin embargo, los análisis de duplicados de las muestras de las plantas fuentes realizados en el año 2007, también positivas a *Begomovirus*, amplificaron un producto de PCR de 1100 pb (Fig 1), que arrojó un porcentaje de identidad del 94% con el Venezuela tomato geminivirus (N° de accesión en GeneBank: AF026464), caracterizado parcialmente (1159 pb) por Guzman *et al* (1997) y posteriormente denominado ToVEV por Argüello-Astorga & Ruiz-Medrano (2001) lo que fue referido anteriormente. Hay que destacar que ésta secuencia parcial no incluye la región central del gen que codifica la cubierta proteica (CP), por lo cual quedó excluido del análisis de Brown *et al* (2001). El ensamblaje de los fragmentos de 1300 pb y 550 pb (ambos fragmentos coinciden en 200 pb aproximadamente en el extremo 5' del gen AV1), generó un fragmento cercano a 1550 pb. Al comparar este fragmento con el ToYMV descrito como PYMV por Coutts *et al* (1991) en papa, así como con el aislado del ToYMV del Valle del Cauca en tomate (Martínez 2008), el porcentaje

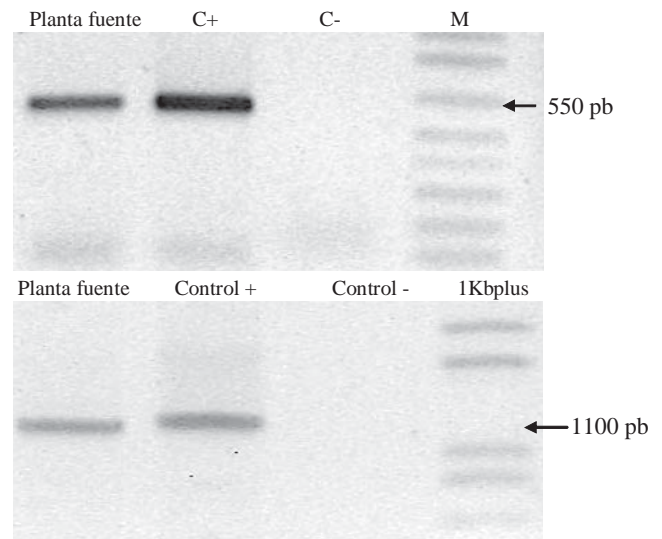


Fig 1 Detección de begomovirus en plantas sintomáticas de ToVEV. Las flechas indican 550 pb y 1100 pb, M: 1Kbplus, C-: control negativo, C+: control positivo y la planta fuente del ToVEV.

de identidad nucleotídica fue inferior al 80%, por lo que se considera un virus diferente al ToYMV. Este fragmento de 1550 pb también mostró un 94% de identidad nucleotídica con el denominado ToVEV. Sin embargo, la secuenciación completa de este begomovirus se encuentra en progreso con el fin de tener mayor precisión sobre la identidad y ajustar la nomenclatura de este virus, de acuerdo a las normas establecidas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, siglas en inglés) para este grupo de virus (Fauquet *et al* 2005).

Caracterización molecular de individuos de *B. tabaci* provenientes de la colonia libre de virus.

En la Tabla 1 se observa la distancia dentro y entre cada población. Dentro de cada biotipo la mayor amplitud de distancia se observa en el biotipo A (0,64 a 0,93). El biotipo B, así como la colonia de *B. tabaci*, mostraron la misma amplitud para la distancia dentro de las poblaciones (0,77 a 0,95). Al analizar las distancias entre los genotipos de las tres poblaciones se observa la similitud de los individuos de la colonia libre de virus con los individuos del biotipo B (resaltados en negritas; 0,64-0,95), en contraste con los individuos del biotipo A (0-0,29). Estos resultados indican que los individuos de la colonia de *B. tabaci* usados para los ensayos de transmisión del virus en este estudio pertenecen al biotipo B reportado en Venezuela a principios de esta década (Salas & Arnal 2001).

Efecto del número de adultos sobre la transmisión del virus.

La Fig 2 muestra la secuencia de aparición de síntomas de acuerdo al número de adultos previamente alimentados sobre plantas enfermas a los cuales fueron expuestas plantas sanas. Para el caso de un solo insecto vector, los síntomas comenzaron a ser detectados a los 15 días después de la exposición con un máximo de dos plantas para el día 16. Las plantas inoculadas por 5, 10, 15 y 20 insectos comenzaron a mostrar síntomas en menor tiempo, 10-11 días posterior al período de acceso para

Tabla 1 Matriz de distancia entre los genotipos de individuos de la colonia libre de virus (1zu1-6zu1) y los biotipos A (1a-6a) y B (1b-6b) de *Bemisia tabaci* mediante secuencias microsatélites

	1b	2b	3b	4b	5b	6b	1a	2a	3a	4a	5a	6a	1zu1	2zu1	3zu1	4zu1	5zu1
2b	0,91																
3b	0,86	0,95															
4b	0,91	0,82	0,86														
5b	0,86	0,77	0,77	0,91													
6b	0,86	0,86	0,91	0,86	0,77												
1a	0,14	0,14	0,14	0,14	0,07	0,14											
2a	0,21	0,21	0,21	0,21	0,14	0,21	0,93										
3a	0,29	0,21	0,21	0,29	0,21	0,29	0,86	0,79									
4a	0,29	0,21	0,21	0,29	0,36	0,29	0,71	0,79	0,86								
5a	0,14	0,07	0,07	0,14	0,21	0,14	0,71	0,64	0,86	0,86							
6a	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0	0,86	0,79	0,71	0,71	0,86						
1zu1	0,82	0,82	0,82	0,77	0,77	0,86	0,14	0,21	0,29	0,29	0,14	0,00					
2zu1	0,86	0,86	0,86	0,82	0,82	0,91	0,14	0,21	0,29	0,29	0,14	0,00	0,95				
3zu1	0,77	0,86	0,86	0,73	0,68	0,82	0,14	0,21	0,21	0,21	0,07	0,00	0,86	0,86			
4zu1	0,82	0,82	0,86	0,82	0,73	0,95	0,14	0,21	0,29	0,29	0,14	0,00	0,86	0,86	0,82		
5zu1	0,77	0,77	0,82	0,77	0,68	0,86	0,14	0,21	0,29	0,29	0,14	0,00	0,86	0,86	0,86	0,91	
6zu1	0,73	0,73	0,73	0,68	0,64	0,77	0,14	0,21	0,29	0,29	0,14	0,00	0,82	0,82	0,77	0,82	0,86

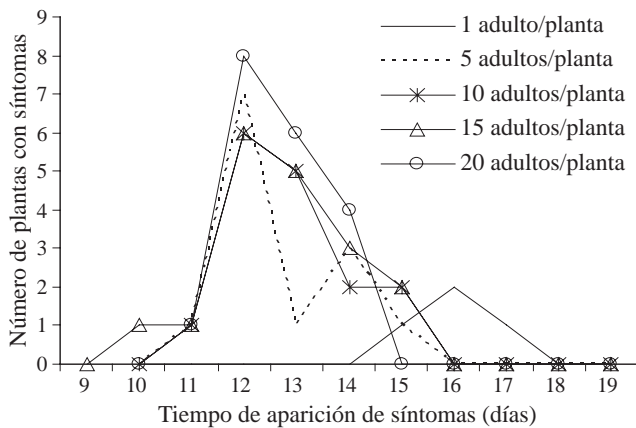


Fig 2 Número de plantas de tomate con síntomas de ToVEV postexposición a diferente número de insectos vectores. Maracaibo, Venezuela.

inoculación, alcanzando todos ellos el mayor pico el día 12, cuya magnitud en general fue directamente proporcional al número de insectos vectores utilizados. En la Fig 3 se aprecia la acumulación en el tiempo de los porcentajes de plantas que mostraron síntomas de la enfermedad, cuyas manifestaciones se completaron en un lapso de 3-6 días, alcanzando los valores máximos entre el día 14 y el 17. Esto demuestra que 30 días como tiempo de evaluación fue suficiente, aunque en el caso de plantas menos susceptibles al virus, la manifestación de los síntomas podría retardarse. Tanto la Fig 3 como la Tabla 2 muestran que el porcentaje de plantas sintomáticas aumentó con el número de insectos vectores, siendo considerable la diferencia entre uno y cinco adultos (más de tres veces

mayor), lo cual coincide con los resultados obtenidos por Brown & Nelson (1988) con el Tomato chino virus (ToChV), begomovirus bipartito. A partir de ese número, los porcentajes de transmisión aumentan en forma gradual, hasta un máximo de 95%, coincidiendo aproximadamente con los resultados obtenidos con iguales números de insectos por planta para *Begomovirus* bipartito (Cohen et al 1983) y monopartito (Mehta et al 1994).

La transmisión por un solo adulto produjo el menor porcentaje de plantas enfermas (Tabla 2, $P < 0,05$) con mayor tiempo requerido para la aparición de los síntomas, siendo

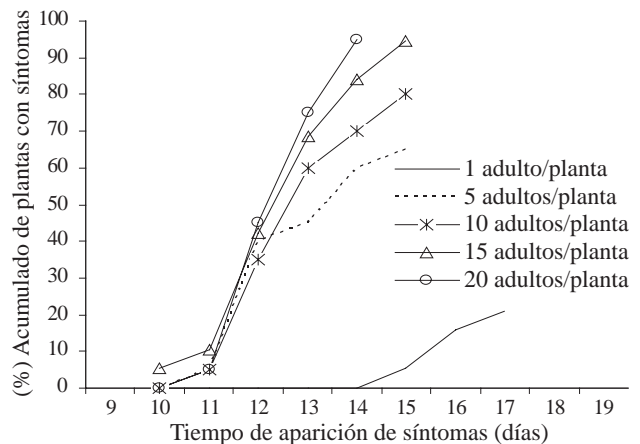


Fig 3 Porcentaje acumulado en el tiempo de plantas de tomate con síntomas de ToVEV después de expuestas a diferentes números de adultos de *B. tabaci* previamente alimentados en plantas enfermas. Período mayo-agosto 2000, Maracaibo, Venezuela.

Tabla 2 Porcentaje de plantas con síntomas de ToVEV después de dos observaciones según el número de adultos/planta, bajo condiciones de jaula-umbráculo. Período mayo-agosto de 2000, Maracaibo, Venezuela. (n = 2).

Adultos/planta	% de plantas sintomáticas
1	21,7 ± 3,79 b
5	67,9 ± 3,24 ab
10	80,0 ± 3,24 a
15	94,4 ± 1,80 a
20	95,0 ± 1,62 a

R²: 0,90, CV: 17,31, F: 11,63, P > F: 0,01. Media ± error estándar. Medias con igual letra no difieren significativamente. Comparaciones de media hechas con la prueba de Tukey (P < 0,05).

significativamente diferente del resto de los tratamientos (Tabla 3, P < 0,05). Entre estos últimos, hubo menor diferencia; no obstante, la proporción de transmisión aumenta (Tabla 2, Fig 3) y el tiempo para la aparición de síntomas se acorta con el incremento en el número de insectos vectores (Tabla 3).

La Fig 4 muestra como el tiempo promedio de aparición de síntomas disminuye a medida que el número de insectos aumenta en contraste con el porcentaje acumulado de plantas sintomáticas, el cual se incrementa. Estos valores sugieren la velocidad con la que pueden desarrollarse las epifitias en campo cuando existen altas poblaciones de *B. tabaci* y plantas infectadas con el virus usado es este estudio.

Adquisición del virus por *B. tabaci* como ninfa y transmisión como adulto. La Fig 5 y la Tabla 4 muestran que *B. tabaci* es capaz de adquirir el virus durante su fase ninfal y posteriormente transmitirlo al transformarse en adulto sin necesitar alimentación adicional sobre plantas enfermas. Esto corrobora la transmisión de tipo circulativa del virus, tal como ha sido reportado para otros begomovirus (Liu *et al* 1997, Jiang

Tabla 3 Tiempo promedio para aparición de síntomas del ToVEV en plantas de tomate expuestas a diferentes números de adultos de *Bemisia tabaci* previamente alimentados sobre plantas enfermas. Período mayo-agosto de 2000, en Maracaibo, Venezuela.

Adultos/planta	Tiempo (días)	n
1	16,0 ± 0,81 a	4
5	12,6 ± 2,03 b	13
10	12,9 ± 1,15 b	16
15	12,8 ± 1,64 b	18
20	12,7 ± 1,30 b	19

R²: 0,55, CV: 10,76, F: 1,88, P > F: 0,01. Media ± desviación estándar. Comparaciones de medias realizadas mediante la prueba de Mínimos Cuadrados (P < 0,01). Medias con igual letra no difieren significativamente. n = número de plantas evaluadas.

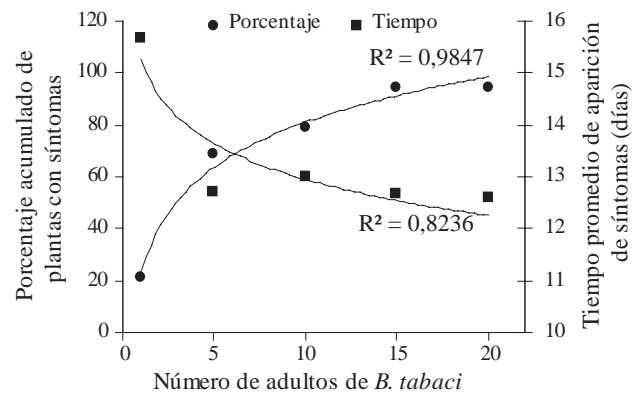


Fig 4 Ajustes logarítmicos para porcentajes acumulados de plantas con síntomas de ToVEV y tiempos promedios para la aparición de los mismos, de acuerdo al número de adultos de *B. tabaci* utilizados para transmitirlos.

et al 2000). Cuando adquirió solo como ninfa, la transmisión resultó tan eficiente como la ocurrida con igual número de adultos jóvenes provenientes de la colonia sana, después de un período de adquisición de 24h. En ambos casos, el tiempo promedio para la aparición de los síntomas resultó bastante similar (Tabla 4).

Cuando *B. tabaci* se desarrolló sobre plantas enfermas y luego como adulto recién emergido tuvo acceso para adquisición adicional del virus, los síntomas virales en las plantas inoculadas comenzaron a aparecer más temprano y aumentaron rápidamente, alcanzando el 100% de plantas con síntomas para el día 10 después del período de acceso para inoculación por el adulto (Fig 5). El tiempo promedio para aparición de síntomas (Tabla 4) fue aproximadamente 28% menor que en los otros dos casos. Esto sugiere que la cría del insecto sobre plantas enfermas y la adquisición adicional como adulto aumenta considerablemente su eficiencia como vector de la enfermedad.

Estas tres situaciones, aunque no comparables analíticamente, por ser producto de dos experimentos diferentes, podrían constituir aproximaciones a las etapas

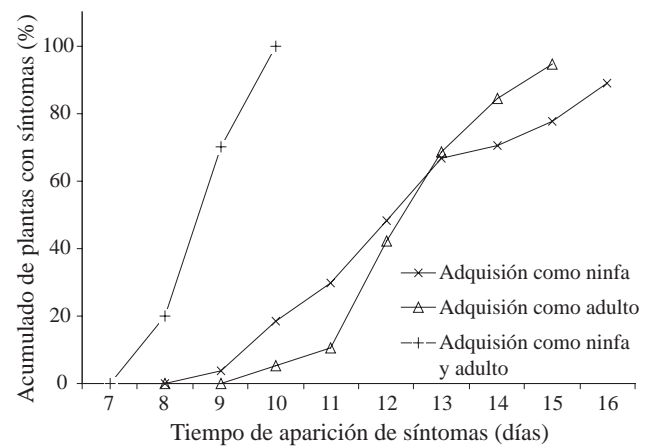


Fig 5 Proporciones acumuladas de plantas de tomate con síntomas de ToVEV según la fase de adquisición del virus por el insecto. Período mayo-agosto 2000, Maracaibo, Venezuela.

Tabla 4 Eficiencia de transmisión de ToVEV por *Bemisia tabaci* de acuerdo a su etapa de desarrollo durante la adquisición. Maracaibo, Venezuela, mayo 2000.

Fase del insecto en adquisición	% transmisión	Tiempo (días)	n
Ninfa	88,3 ± 2,30	12,6 ± 2,30	30
Adulto	94,4 ± 1,76	12,8 ± 1,39	20
Ninfa y adulto	100,00	9,1 ± 0,68	10

Media ± error estándar; n = número de plantas evaluadas

del desarrollo de una epifitía del virus. En el caso de cultivos de ciclo corto como el tomate (aproximadamente cuatro meses), cuando se produce en una época restringida del año, como es el caso de la zona del río Limón, antes referida, donde solo es posible durante la época más fresca y seca del año (noviembre-abril), cada ciclo de cultivo inicia una sucesión agroecológica. En términos epifitóticos, la sucesión al principio se caracteriza por la existencia de pocas plantas fuentes del virus en el campo (algunas plantas infectadas de tomate remanentes del ciclo anterior, así como plantas espontáneas de otras especies, hospederas del virus), asociada con bajas poblaciones endémicas de *B. tabaci*. Algunos de estos insectos se desarrollan sobre plantas infectadas con el virus, pero dada su gran polifagia muy seguramente la mayor parte de ellos lo harán sobre diversas especies de plantas, muchas de las cuales no están infectadas. En consecuencia, la proporción de insectos virulíferos dentro de esa población tenderá a ser baja. Además, la distribución de estas plantas dentro de la comunidad vegetal suele ser dispersa, por lo que resulta poco probable que por dispersión entre plantas, adultos no virulíferos lleguen a plantas infectadas y adquieran el patógeno. Así, al comenzar la colonización de los nuevos campos de tomate, solo una baja proporción de estos insectos colonizadores serán virulíferos, pero ellos serían suficientes para iniciar la epifitía. Los individuos colonizadores no virulíferos, simplemente aportarán al aumento de la población dentro del sembradío, pero a medida que esto ocurre, la probabilidad que individuos no infectados entren en contacto con plantas enfermas, igualmente aumenta (adquisición del virus solo como adulto). Así mismo, se incrementa la factibilidad que adultos de *B. tabaci*, en las siguientes generaciones provengan de ninfas criadas sobre plantas enfermas y al menos inicialmente se alimenten sobre las mismas (adquisición del virus como ninfa y como adulto). La creciente participación de adultos dentro de esta última categoría en la dispersión del virus dentro del campo, por su mayor eficiencia de transmisión, tenderá a acelerar la epifitía. De esa manera, a medida que avanza la temporada de producción en una zona, podría aumentar la proporción de plantas infectadas dentro de los sembradíos, lo cual cada vez sería con plantas más jóvenes, impidiendo el desarrollo y producción de las mismas. A grandes rasgos esa fue la secuencia de eventos observados durante la epifitía ocurrida en la zona del río Limón, estado Zulia, durante la temporada de tomate de 1997-1998.

Efecto del virus sobre el crecimiento de la planta. El ToVEV

en este experimento redujo significativamente el crecimiento de las plantas sintomáticas. Tanto la altura como el área foliar y el peso seco de las plantas sintomáticas, resultaron aproximadamente la mitad de esos valores para plantas no sintomáticas (Tabla 5, $P < 0,05$). Esta deficiencia de crecimiento es particularmente relevante cuando la infección ha ocurrido en estados tempranos del desarrollo vegetativo, reduciéndose así las posibilidades de alcanzar su potencial de rendimiento. Las deformaciones de hojas y ramas causadas por este virus afectan el desarrollo y rendimiento de la planta de tomate con mayor o menor intensidad, de acuerdo a cuan temprano en el desarrollo de la planta haya ocurrido la infección, tal como ha sido reportado para el ToYMV en tomate (Franke *et al* 1983). La clorosis de hojas relacionada con la disminución en el contenido de clorofila, así como cambios a nivel de cloroplastos y de funcionamiento de los fotosistemas, redundan en reducción de la tasa fotosintética, en *Eupatorium makinoi* infectada con geminivirus (Funayama-Noguchi y Terashima 2006). Leal y Lastra (1984) observaron el aumento en la tasa respiratoria y reducida capacidad de exportación de fotoasimilados desde las hojas, en plantas en tomate infectadas con ToYMV.

A manera de consideración final, la eficiencia de transmisión en términos del porcentaje de plantas infectadas y el tiempo de aparición de síntomas, resultó ser superior a medida que aumentó el número de insectos vectores, lo cual es de esperar en cualquier experimento de transmisión biológica ya que tanto la adquisición como la transmisión están sujetas a variaciones en esa relación de tres niveles tróficos (planta-insecto-virus) y la cantidad de contactos aumentará las posibilidades de transmisión. La adquisición prolongada, al desarrollarse el insecto vector sobre la planta infectada y luego alimentarse sobre ella como adulto, parece acelerar este proceso. Por consiguiente, además de la existencia de plantas fuentes del virus, éste, puede ser propagado a mayor número de plantas en menor tiempo, cuando se desarrollan altas poblaciones de mosca blanca en el campo. En consecuencia, dentro de las estrategias de manejo de plagas en tomate, resulta importante asegurarse de no favorecer el desarrollo de las mismas, mediante la aplicación de prácticas inadecuadas.

Tabla 5 Promedios de altura, área foliar, peso seco total y para plantas sanas no expuestas a *Bemisia tabaci* y plantas expuestas que desarrollaron síntomas de ToVEV.

Tratamiento	Altura (cm)	Área foliar (cm ²)	Peso seco total (g)	n
Plantas no expuestas	46,8 ± 4,09 a	436,4 ± 69,61 a	4,4 ± 0,45 a	5
Plantas con síntomas	25,8 ± 3,90 b	240,8 ± 35,31 b	2,3 ± 0,42 b	5

Altura: R^2 : 0,91, CV: 9,62, F: 90,37, $P > F$: 0,0001; área foliar: R^2 : 0,89, CV: 11,3, F: 65,04, $P > F$: 0,0001; peso seco total: R^2 : 0,95, CV: 8,12, F: 152,87, $P > F$: 0,0001. Media ± desviación estándar. Medias con igual letra no difieren significativamente. Comparaciones de media hechas con la prueba de Tukey ($P < 0,05$); n = número de plantas evaluadas

Agradecimientos

A Dra Judith Brown de la Universidad de Arizona, USA por facilitar muestras de poblaciones de los biotipos A y B de *B. tabaci*. Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por haber cofinanciado la presente investigación a través de la subvención G-2000001610, así como el proyecto “Esterilizador de Suelos”. AFUNDACITE-Zulia, por el sostenido apoyo a nuestros proyectos. Al Convenio Cuba-Venezuela por el cofinanciamiento dentro del proyecto “Estudio y caracterización de la variabilidad genética de plagas emergentes en los ecosistemas agrícolas”.

Referencias

- Argüello-Astorga G R, Ruiz-Medrano R (2001) An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch Virol* 146:1465-1485.
- Bedford I, Markham P, Brown J, Rosell R (1994) Geminivirus transmission and biological characterization of whitefly (*Bemisia tabaci*) biotypes from different world regions. *Ann Appl Biol* 125: 311-325.
- Bowcock A M, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd J, Cavalli-Sforza L (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457.
- Brown J K, Idris A M, Torres-Jerez I, Banks G K, Wyatt S D (2001) The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Arch Virol* 146: 1581-1598.
- Brown J K, Nelson M R (1988) Transmission, host range, and virus-vector relationships of Chino del tomate virus (CdTV), a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa. *Plant Dis* 72:866-869.
- Cohen S, Duffus J E, Larsen R C, Liu H Y, Flock R A (1983) Purification, serology, and vector relationships of Squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology* 73:1669-1673.
- Coutts R H A, Coffin R S, Roberts E J F, Hamilton W D O (1991) The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of potato yellow mosaic virus. *J Gen Virol* 72: 1515-1520.
- De Barro P J, Scott K D, Graham G C, Lange C L, Schutze M K (2003) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. *Mol Ecol Notes* 3: 40-43.
- Debrot E, Centeno F (1985) Infección natural de la papa en Venezuela con el mosaico amarillo del tomate, un geminivirus transmitido por moscas blancas. *Agron Trop* 1 35: 125-138.
- Debrot E, Herold F, Dao F (1963) Notas preliminares sobre el amarillamiento del tomate en Venezuela. *Agron Trop* 10: 33-41.
- Debrot E A (1981) Natural infection of potatoes in Venezuela with the whitefly transmitted mosaico amarillo del tomate virus. Programme and abstracts of the International Workshop on Pathogens Transmitted by Whiteflies. Keeble College, Oxford.
- Fauquet C M, Maxwell D P, Gronenborn B, Stanley J (2000) Revised proposal for naming geminiviruses. *Arch Virol* 145: 1743-1761.
- Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L A (2005) Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academy Press, London, San Diego, 1162p.
- Franke G, Van Balen L, Debrot E (1983) Efecto de la infección por el mosaico amarillo sobre el rendimiento del tomate. *Rev Fac Agron (LUZ)* 6: 741-743.
- Funayama-Noguchi S, Terashima I (2006) Effects of Eupatorium yellow vein virus infection on photosynthetic rate, chlorophyll content and chloroplast structure in leaves of *Eupatorium makinoi* during leaf development. *Funct Plant Biol* 33: 165-175.
- Geraud-Pouey F, Chirinos D, Rivero G (1995) Artrópodos asociados con el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Venezuela. *Bol Entomol Venez* 19:31-49.
- Guzman P, Arredondo C R, Emmatty D, Portillo R J, Gilberton R L (1997) Partial characterization of two whitefly-transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant Dis* 81: 312.
- Jiang X Y, De Blas C, Barrios L, Fereres A (2000) Correlation between whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) feeding behavior and transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Ann Entomol Soc Am* 93: 573-579.
- Lastra J R, Uzcátegui R C (1975) Viruses affecting tomatoes in Venezuela. *Phytopathol Z* 84:253-258.
- Leal N, Lastra R (1984) Altered metabolism of tomato plants infected with tomato yellow mosaic virus. *Physiol Plant Pathol* 24: 1-7.
- Liu S J, Belford I D, Briddon R W, Markham P (1997) Efficient whitefly transmission of african cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *J Gen Virol* 78: 1791-1794.
- Martínez A K (2008) Caracterización molecular de un nuevo del tomate en el Valle del Cauca y búsqueda de fuentes de resistencia para el mejoramiento de la variedad Unapal Maravilla. Tesis M.C.A. Código 7205006 Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Postgrado, Palmira, Colombia, 58p.
- Mehta P, Wyman J A, Nakhla M K, Maxwell D P (1994) Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J Econ Entomol* 87:1291-1297.
- Morales F J, Lastra R, Uzcátegui R C, Calvert L (2001) Potato yellow mosaic virus: a synonym of *Tomato yellow mosaic virus*. *Arch Virol* 146: 2249-2253.
- Nava A, Ochoa F, Trujillo G, Geraud F, Hernández L, Lastra R, Rivas G (1996) Detección de virus en zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Venezuela. I. Estados Aragua y Zulia. *Rev Fac Agron (LUZ)* 13: 285-292.

- Nava A R, Patte C P, Hiebert E, Polston J E (2006) Detection and variability of Begomoviruses in tomato from the Andean States of Venezuela. *Plant Dis* 90:61-66.
- Park S (2001) MStools v 3 (Excel spreadsheet toolkit for data conversion). Smurfit Institute of Genetics, Trinity College, Dublin 2, Ireland.
- Roberts E J F, Buck K W, Coutts R H A (1986) A new virus infecting potatoes in Venezuela. *Plant Dis* 77: 340-327.
- Rojas M R, Gilbertson R L, Russell D R, Maxwell D P (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis* 77: 340-347.
- Salas J, Arnal E (2001) *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1899) biotipo B, primer registro para Venezuela utilizando RAPD's- PCR. *Entomotropica* 16: 181-185.
- SAS Institute Inc (1996) Programa estadístico SAS para microcomputadoras. Versión 6 Cary NC. EE.UU.
- Tsagkarakou A, Roidakis N (2003) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Mol Ecol Notes* 3: 196-198.
- Wyatt S D, Brown J K (1996) Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 1288-1293.
- Zambrano K, Carballo O, Geraud F, Chirinos D, Fernández C, Marys E (2007) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Venezuela. *Plant Dis* 91: 768.

Received 12/XII/07. Accepted 16/XI/09.
