

Evaluación agronómica de híbridos costarricenses de tomate para mesa
con genes de resistencia al virus de la cuchara (Tomato yellow leaf curl
virus, TYLCV-IL)

Dayana María Rodríguez Jiménez

TESIS PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGRÓNOMO CON EL GRADO DE LICENCIADA EN
AGRONOMÍA

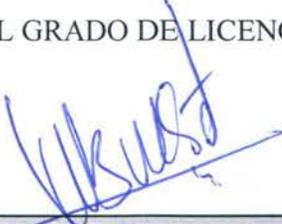
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

2023

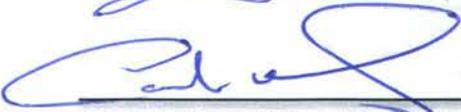
**Evaluación agronómica de híbridos costarricenses de tomate para mesa con genes
de resistencia al virus de la cuchara (Tomato yellow leaf curl Israel virus,
TYLCV-IL)**

Dayana María Rodríguez Jiménez

TESIS PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO CON
EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA


Walter Barrantes Santamaría, Ph.D.

DIRECTOR DE TESIS


Carlos Echandi Gurdián, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL


Natalia Barboza Vargas, Dra.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL


Gustavo Quesada Roldán, Dr.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL


Luis Gómez Alpizar, Ph.D.

DIRECTOR DE ESCUELA


Dayana Rodríguez Jiménez

SUSTENTANTE

Tabla de contenidos

Dedicatoria.....	10
Agradecimientos	11
Resumen	12
Ficha bibliográfica	14
Introducción.....	15
Objetivos	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos.....	17
Revisión de literatura.....	18
Virus de la cuchara: generalidades del taxón	18
Transmisión del Tomato yellow leaf curl Israel virus (TYLCV-IL).....	18
Introgresión de genes de resistencia al TYLCV en plantas de tomate	19
Piramidación de genes.....	20
Detección del virus en Costa Rica.....	21
Prodigio: único híbrido nacional con resistencia a <i>Ralstonia solanaceaurum</i>	22
Búsqueda de rendimiento y calidad comercial.....	22
Metodología.....	24

Sitio experimental y delimitación temporal	24
Material vegetal.....	24
Preparación de almácigo de tomate.....	26
Protocolo para el establecimiento del pie de cría de mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i>).27	
Inoculación del virus TYLCV usando el vector mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i>)	27
Establecimiento de las plantas bajo condiciones controladas en invernadero	28
Método de detección del virus en campo	32
Control del vector en campo	33
Evaluación de la incidencia y severidad del TYLCV-IL	33
Evaluación agronómica	34
Diseño experimental.....	36
Análisis estadístico.....	36
Resultados y discusión.....	37
Tolerancia al TYLCV.....	37
Rendimiento	44
Desempeño agronómico.....	48
<i>Crecimiento fenológico</i>	48
.....	48
<i>Comportamiento reproductivo</i>	50
<i>Calidad de frutos poscosecha</i>	51
Conclusiones.....	53
Recomendaciones	54
Bibliografía	55

Índice de cuadros

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en el estudio de híbridos de tomate costarricenses introgresados con genes de resistencia al Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) <i>Ty-1/ Ty-3</i> y <i>Ty-2</i>	25
Cuadro 2. Procedencia de los genes <i>Ty</i> empleados en la investigación para la introgresión de resistencia en tomate para mesa <i>S. lycopersicum</i>	26
Cuadro 3. Concentraciones de elementos (ppm) utilizadas según cada etapa fenológica del cultivo.	30
Cuadro 4. Escala numérica (0-4) y descriptiva de los síntomas para evaluar la severidad de Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) en las plantas (Ver anexo 2).	33
Cuadro 5. Porcentajes de severidad (IS) de los cuatro tratamientos utilizados para evaluar la tolerancia en los híbridos experimentales. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según la prueba de LSD Fisher, realizada mediante un Modelo Lineal Generalizado Mixto.	38
Cuadro 6. Resultado de los contrastes que indican diferencias en el índice de severidad (%) entre tratamientos. Realizado a través de la prueba de contrastes, con un valor de significancia de 0.05.	41
Cuadro 7. Resultado de hibridación y PCR para la primera (30 DDS) y segunda evaluación (161 DDS) para cada uno de los tratamientos. El texto marcado en rojo indica los resultados que no fueron concordantes entre hibridación y PCR.	42
Cuadro 8. Promedio de variables poscosecha de calidad de fruto: peso, ancho, alto, número de lóculos, °Brix y firmeza de los frutos de tomate.	51

Índice de figuras

- Figura 1.** Plantas de tomate trasplantadas en el invernadero, posterior a su inoculación con el virus TYLCV-IL en bolsas negras de 16 L con sustrato inerte de fibra de coco. El riego y la nutrición fueron aportados mediante fertirriego con dos goteros por bolsa (las hileras de los costados norte y sur del invernadero corresponden a bordes).29
- Figura 2.** Distribución del caudal por gotero muestreado.30
- Figura 3.** Área bajo la curva de la incidencia para cada tratamiento, a través de las 14 evaluaciones semanales. T1 corresponde al tratamiento con los genes *Ty-1/Ty-3*, T2 corresponde al tratamiento con el gen *Ty-2*, T3 corresponde al tratamiento con los genes *Ty-1/Ty-3/Ty-2* y T5 es el testigo resistente. (T4 corresponde al testigo susceptible, el cual no se tomó en cuenta para el análisis estadístico). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.37
- Figura 4.** Porcentaje del índice de severidad (%) de los tratamientos a través de 14 evaluaciones semanales. T1 corresponde al tratamiento con los genes *Ty-1/Ty-3*, T2 corresponde al tratamiento con el gen *Ty-2*, T3 corresponde al tratamiento con los genes *Ty-1/Ty-3/Ty-2* y T5 es el testigo resistente. (T4 corresponde al testigo susceptible, el cual no se tomó en cuenta para el análisis estadístico). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.39
- Figura 5.** Análisis estadístico del rendimiento total (kg m^{-2}) de cada uno de los tratamientos y partición por categoría de clasificación (1°, 2°, 3°, frutos deformes y enfermos). Columnas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba Tuckey.45
- Figura 6.** (A) Análisis estadístico del rendimiento de frutos de 1° categoría de calidad (kg m^{-2}) con un valor de $p=0,0001$ (altamente significativo) y $CV=12,27$. (B) Rendimiento de frutos de 2° categoría de calidad (kg m^{-2}) (derecha) con un valor

de $p=0,0603$ (no significativo) y $CV=16,18$. Columnas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba Tuckey.46

Figura 7. Longitud del tallo (cm) **(A)** y diámetro del tallo (cm) **(B)** de las plantas de tomate, evaluadas a través del tiempo desde los 15 hasta los 78 días después del trasplante (DDT).....48

Figura 8. Altura del primer racimo (cm) **(A)** y distancia entre el primer y segundo racimo (cm) **(B)** de las plantas de tomate. Ambas variables evaluadas a un valor de significancia de 0,05. Columnas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba Tuckey.....49

Figura 9. Número de frutos en el primer y segundo racimo. Ambas variables evaluadas a un valor de significancia de 0,05. Columnas del mismo racimo con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba Tuckey.50

Figura 10. Análisis estadístico del tamaño de cicatriz apical (cm^2) de cada uno de los tratamientos en la primera y la segunda evaluación poscosecha obtenido mediante el programa ImageJ. Columnas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba Tuckey. Evaluaciones realizadas a los 78 y 156 DDT, respectivamente.52

Índice de anexos

Anexo 1. Diagrama de la disposición del diseño experimental en el invernadero de Hortalizas, de la EEAFBM	62
Anexo 2. Escala visual para la cuantificación de la severidad del virus de la cuchara (Tomato yellow leaf curl virus) (Lapidot y Fridmann, 2002).	63
Anexo 3. Concordancia entre los resultados de la primera hibridación “Dot blot” con sondas y los resultados del PCR realizados a muestras de tejido foliar de tomate a los 30 DDT. Las muestras analizadas, se eligieron por presentar síntomas en campo. .	64
Anexo 4. Concordancia entre los resultados de la segunda hibridación “Dot blot” con sondas y los resultados del PCR realizados a muestras de tejido foliar de tomate a los 161 DDT. Las muestras analizadas, se eligieron por presentar síntomas en campo. .	65
Anexo 5. Fotografías de los frutos representativos por tratamiento para medir el área de cicatriz apical con el uso del Software ImageJ durante la primera evaluación. A) Tratamiento 1. B) Tratamiento 2. C) Tratamiento 3. D) Tratamiento 4. E) Tratamiento 5.....	66
Anexo 6. Resultados de la primera hibridación con sondas realizado en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.	67
Anexo 7. Resultados de la segunda hibridación con sondas realizado en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.	68
Anexo 8. (a) Temperatura (°C) promedio, máxima y mínima durante todo el ciclo del cultivo. (b) Humedad relativa promedio, máxima y mínima durante todo el ciclo del cultivo. Datos obtenidos de un Data Logger marca HOBOWare®, ubicado dentro del invernadero.	69

Dedicatoria

Ante todo, a Dios, por el don de la sabiduría, para poder llevar a cabo esta tesis.

A mis papás Wilber y Cecilia, por darme siempre todo el apoyo incondicional, amor y consuelo que una persona pueda necesitar.

A mis abuelitos en el cielo papá Roque y mamá Arabela por cuidarme siempre y a mis abuelitos aquí en la Tierra Flor y Miguel, por darme los mejores consejos y hacerme reír.

A mi hermana Pamela, por ser mi eterna cómplice y amiga fiel.

A mi novio Sisgo, por su cálida compañía y amor.

¡Los amo y gracias!

Agradecimientos

Primeramente, gracias a la Universidad de Costa Rica por todas las oportunidades para poder estudiar y llevar a cabo esta tesis.

A los profesores Walter Barrantes, Carlos Echandi y Natalia Barboza por ser mis tutores y todo el acompañamiento en este tiempo, a pesar de tantas dificultades, pandemia, trabajos, tiempo, etc. Aprendí mucho de ustedes.

A los colaboradores de la EEAFBM que me ayudaron con evaluaciones, montar muestras en laboratorio, cosechas y todo lo que conllevó la preparación del cultivo: Elodia, Giovanni, Marco, Elizandro, Deivi, Milton, etc.

También a Eduardo por ayudarme con las muestras en el CIBCM, a Carlos por ayudarnos con temas de riego, a don Julio por ayudarme con la toma de datos climáticos.

A las colegas Jéssica, Claudia y Fabiola, por todo su trabajo realizado en el invernadero y laboratorio.

A don Jose María y don Jose Miguel, que me enseñaron mucho y me dieron muy buenos consejos para continuar con la tesis y con buena actitud.

A todos, ¡gracias!,

Dayana.

Resumen

Introducción. El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una hortaliza de gran valor económico a nivel mundial, ya que se producen unos 180 millones de toneladas al año. En el 2014 se detectó el virus de la cuchara (Tomato yellow leaf curl Israel virus, TYLCV-IL) en plantaciones comerciales de tomate en Costa Rica. Con el fin de obtener semillas de procedencia costarricense, con resistencia o tolerancia a este virus, se les ha introgresado, utilizando la mejora genética, genes de resistencia a tres nuevas líneas procedentes del híbrido Prodigio. **Objetivo.** Determinar si tres híbridos de tomate costarricenses introgresados con genes de resistencia al Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) *Ty-1/Ty-3* y *Ty-2* en distintas combinaciones piramidales, mejoran la resistencia al virus y muestran crecimiento y rendimiento comparable con dos híbridos comerciales. **Metodología.** Se establecieron en invernadero cinco tratamientos con cuatro repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño irrestricto al azar. Tres de los tratamientos utilizados correspondieron a híbridos promisorios con genes de resistencia al TYLCV en distintas combinaciones piramidales, el cuarto fue el híbrido Prodigio (testigo susceptible) utilizado para evaluar el crecimiento y rendimiento, y el quinto fue el híbrido comercial resistente importado, utilizado para evaluar resistencia o tolerancia al virus y el rendimiento comercial de frutos respecto a las versiones del nuevo híbrido. Se evaluó la incidencia y severidad del virus, mediante evaluaciones en campo con el empleo de una escala visual de severidad de síntomas, además se utilizó la hibridación molecular con sondas marcadas y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar la presencia o ausencia del virus en las plantas. Se evaluó también el rendimiento y calidad de los frutos mediante evaluaciones fenológicas en cada cosecha y evaluaciones postcosecha de los frutos. **Resultados.** Los híbridos que poseen los genes de resistencia *Ty-2* y la combinación piramidal *Ty-1/Ty-3/Ty-2*, son los que cumplen de mejor manera con los objetivos de esta investigación, ya que poseen la menor incidencia e índice de severidad ante el virus TYLCV, en comparación con el testigo comercial resistente; además, poseen un rendimiento y desempeño agronómico comparables al híbrido Prodigio. **Conclusión.** Se rechaza la hipótesis nula de esta investigación, la cual propone que entre más cantidad de genes de resistencia posea una variedad (piramidación de genes) mayor tolerancia al virus se obtiene ya que no presenta

diferencias significativas con otros tratamientos, sin embargo, se recomienda seguir poniendo a prueba estos híbridos para localizar resistencia más prolongada y de amplio espectro.

Ficha bibliográfica

Rodríguez Jiménez, Dayana María. “Evaluación agronómica de híbridos costarricenses de tomate para mesa con genes de resistencia al virus de la cuchara (Tomato yellow leaf curl Israel virus, TYLCV-IL)” Tesis para optar al título profesional de Ingeniera Agrónoma con el grado de Licenciada en Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Director: Walter Barrantes Santamaría.

Palabras clave: Virus de la cuchara, mosca blanca, genes de resistencia, mejoramiento genético, retrocruces, híbridos de tomate costarricense.

Introducción

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* Linneus) es una hortaliza de gran valor económico a nivel mundial. Su demanda está en crecimiento, debido a sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas presentes en el licopeno, pigmento carotenoide que brinda el color rojo al fruto (Rodríguez et al., 2017).

El tomate es la hortaliza más difundida en el mundo (junto con la papa), ya que se producen 180 millones de toneladas al año (Lahoz et al., 2020). Según la última memoria anual publicada por la Oficina Nacional de Semillas (ONS), para el año 2020 se importaron 14 443 187 unidades de semillas de tomate a Costa Rica, con un peso total de 172,02 kg, lo que equivale en dólares a un monto de \$1 913 653,73. Además se exportaron 7 307 027 unidades de semillas de tomate, obteniéndose un ingreso en dólares de \$157 245,42.

En el país se encuentran registradas semillas de tomate introducidas desde Estados Unidos, Holanda, Israel, China, entre otros (López, 2016; Matamoros, 2017). Hasta el momento los únicos registros de semillas de tomate producidas en Costa Rica son el híbrido Alteza Villa 768 de la compañía Villaplants de Costa Rica SRL y el híbrido Prodigio de la Universidad de Costa Rica (López, 2016); este último se obtuvo tras más de 17 años de investigación por parte de mejoradores de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM) y con apoyo del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

El híbrido Prodigio ofrece un rendimiento competitivo, adaptabilidad a las condiciones climáticas del país, tolerancia ante la marchitez bacteriana (enfermedad causada por *Ralstonia solanacearum* Smith) y presenta frutos con las características organolépticas solicitadas por el mercado nacional (Goyenaga, 2016). A pesar de esto, no ha obtenido una buena aceptación en el mercado, debido a su susceptibilidad al Tomato yellow leaf curl Israel virus, TYLCV-IL, conocido en el país como virus de la cuchara por los síntomas que se expresan en las plantas infectadas.

El manejo del TYLCV-IL en tomate incluye un paquete tecnológico costoso y difícil de aplicar, se ha tratado de controlar el vector para reducir o eliminar la fuente de inóculo y la transmisión de la enfermedad. De forma tradicional, se utilizan combinaciones de métodos químicos, físicos y culturales, debido a que un solo enfoque en el manejo de la enfermedad

no suele ser eficaz (Kil et al., 2016). Los agroquímicos han sido parcialmente efectivos, ya que la presión del vector dificulta el manejo de la enfermedad, además de la resistencia que se ha ido encontrando en *Bemisia tabaci* a ciertos ingredientes activos que se utilizan para su control (Dueñas, 2012). El uso de barreras físicas como mallas o invernaderos, suponen un costo elevado para los productores, ya que se requiere material y mano de obra en la colocación de estructuras que den soporte y resistan la presión del viento (Kil et al., 2016). El monitoreo constante de plagas, la eliminación de malezas hospederas de mosca blanca o de plantas enfermas, la recolección de frutos caídos ante la posibilidad de transmisión por semillas, la colocación de cultivos trampa, el cambio en la temporada de cultivo o compra de semillas importadas, son otras técnicas empleadas para disminuir las pérdidas en el rendimiento ocasionadas por el TYLCV-IL (Kil et al., 2016).

Uno de los métodos más eficientes empleados en los programas de control integrado del virus, es la selección de cultivares resistentes. La resistencia genética es una medida de control efectiva, pero estos cultivares también deben poseer características agronómicas deseables, adaptabilidad a las condiciones climáticas y edafológicas, para ser utilizados por los productores (Lapidot & Friedmann, 2002; Pacheco, 2017). Durante décadas, se han aprovechado los recursos genéticos provenientes de especies silvestres en programas de mejora, en busca de características de interés agronómico como la resistencia a patógenos, de ahí que decenas de genes han sido introgresados mediante programas de retrocruzamiento en la especie de tomate cultivado (Pacheco, 2017).

Evaluaciones preliminares en diferentes localidades del país, se han enfocado en probar cultivares experimentales de la Universidad de Costa Rica, del INTA e híbridos importados con resistencia al TYLCV-IL, con el fin de disponer de alguna semilla que posea características agronómicas similares a cultivares susceptibles de uso común por los productores (López, 2016, 2018). El programa de mejora genética de solanáceas de la Universidad de Costa Rica, ha producido cultivares procedentes del híbrido Prodigio con introgresión de algunos genes de resistencia recolectados a partir de un parental proveniente del *World Vegetable Center* en Taiwán; por lo tanto, en esta investigación se evaluará la tolerancia que ofrecen estos híbridos al TYLCV, su rendimiento comercial y calidad poscosecha de frutos.

Objetivos

Objetivo general

Determinar si tres híbridos de tomate costarricenses introgresados con genes de resistencia al Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV): *Ty-1/ Ty-3* y *Ty-2* en distintas combinaciones piramidales, mejoran la resistencia al virus y muestran crecimiento y rendimiento comparable con dos híbridos comerciales.

Objetivos específicos

1. Comprobar si el piramidaje de genes de resistencia al TYLCV mejora la resistencia en plantas de tomate inoculadas con el virus.
2. Determinar si los nuevos híbridos de tomate introgresados con los genes de resistencia al TYLCV tienen un crecimiento y rendimiento comparable con dos híbridos comerciales.

Revisión de literatura

Virus de la cuchara: generalidades del taxón

El Tomato yellow leaf curl *virus* (género *Begomovirus*, familia Geminiviridae), posee un genoma monopartita (un solo componente de ácido desoxirribonucleico (ADN) con un tamaño entre 2,5 y 2,8 kilobases (Kb) que es capaz de realizar todos los procesos de replicación y movimiento viral por sí solo (Dueñas, 2012; Yan et al., 2021). Este virus, comúnmente conocido como virus de la cuchara o Virus del enrollamiento amarillo de la hoja de tomate, provoca graves daños en plantas dicotiledóneas de regiones tropicales y subtropicales del mundo, tanto en invernadero, como a campo abierto (Campos et al., 2017; Lapidot & Friedmann, 2002).

Transmisión del Tomato yellow leaf curl Israel virus (TYLCV-IL)

En Costa Rica se ha detectado el aislamiento del Tomato yellow leaf curl Israel virus (TYLCV-IL), el virus se trasmite de plantas enfermas a plantas sanas por insectos vectores, específicamente la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) en forma persistente circulativa (Liu et al., 2021); hasta el momento no hay muchos detalles sobre el potencial de transmisión del virus por medio de semillas o inoculación mecánica aunque algunos autores han realizado algunos reportes a nivel mundial sobre la transmisión por semilla (Kil et al., 2016).

Basta con que el insecto en etapa juvenil o adulta se alimente de una planta enferma, durante 15-30 minutos, insertando su estilete en una planta infectada para que logre adquirir el virus. Los síntomas de la infección pueden aparecer en la planta en un periodo entre 15-20 días después de la inoculación del virus (Bernal, 2010).

El TYLCV-IL es considerado como uno de los tres virus de mayor importancia científica y económica de plantas de tomate a nivel mundial, junto con el Virus del bronceado del tomate, (TSWV o Tomato spotted wilt virus) del género *Tospovirus*, familia Bunyaviridae y el Virus del mosaico del pepino (PepMV o *Pepino mosaic virus*) del género *Potexvirus*, familia Flexiviridae (Verlaan et al., 2013). El TYLCV puede ocasionar hasta el 100 % de pérdida del rendimiento de la producción cuando la infección se da entre los primeros 45 días después de la siembra (Sade et al., 2020). En Costa Rica los daños causados por el TYLCV se han extendido por zonas productoras del Valle Central y Occidente,

generando pérdidas considerables y provocando aumentos de precios del tomate, por ejemplo, para el verano del 2017, el kilo de tomate pasó de €1500 a €2600 (Hilje & Stansly, 2017).

El síntoma más común es el amarillamiento marginal e internerval; y produce enrollamiento de los foliolos (Anexo 2). Cuando la infección ocurre de forma temprana, produce aborto floral, reducción de cuaje de frutos, disminución del tamaño de los frutos, maduración precoz y malformaciones (Arroyo, 2017; Pérez, 2007; Rodríguez et al., 2017).

Introgresión de genes de resistencia al TYLCV en plantas de tomate

La introgresión de genes es un proceso de traspaso estable de material genético de una especie de interés a otra, mediante una serie de repetidos cruzamientos entre ellos y ha sido utilizada para traer características favorables que contienen individuos “no valorizables” a materiales adaptados a condiciones edafoclimáticas; de esta manera se generan genotipos genéticamente valorizados (Caruso et al., 2015).

Como parte de los esfuerzos para obtener plantas con resistencia o tolerancia a este virus, se han rastreado genes con señales de resistencia al virus en fragmentos de cromosomas de especies silvestres de *Solanum*. Utilizando la selección asistida por marcadores moleculares se han identificado estos genes en cultivares susceptibles de tomate lo que ha permitido el rescate de los genes que se han perdido a través de años de domesticación (Sade et al., 2020). Hasta el momento, se han localizado por medio de marcadores moleculares seis genes que confieren resistencia/tolerancia o al TYLCV, denominados *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *Ty-5* y *tcm-1*, que fueron previamente identificados en las especies silvestres de tomate *Solanum chilense* (Dunal) Reiche (*Ty-1*, *Ty-3* y *Ty-4*), *S. habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner (*Ty-2*), *S. peruvianum* (L.) Mill (*Ty-5*) y un híbrido de *S. lycopersicum* llamado Tyking (*tcm-1*) (Verlaan et al., 2013).

El gen *Ty-1* fue el primero identificado para la resistencia al TYLCV, mapeado en diferentes regiones del cromosoma 6, pero se descubrió que los genes *Ty-1* y *Ty-3* podrían ser alelos de un mismo gen, por lo que al compartir una misma región cromosómica están muy ligados entre sí, por lo tanto, se representan de la siguiente manera: *Ty-1/Ty-3* (Butterbach et al., 2014 & Verlaan et al., 2013). El gen *Ty-2* se localiza en el cromosoma 11

y es quien confiere resistencia a algunos linajes del TYLCV en el mundo, tales como cultivares mejorados en Taiwán, norte de Vietnam, el sur de la India e Israel (Dueñas et al., 2009; Vidavski et al., 2008).

Resultados presentados por Barbieri et al. (2010), mostraron las primeras exposiciones de plantas con los genes *Ty-1* y *Ty-2*, inoculados y puestos a prueba con las cepas del TYLCV-IL y TYLCV-Sardinia (TYLCV-Sar), esta última también conocida como Cerdeña. Las plantas con el gen *Ty-1* presentaron tolerancia a TYLCV-IL, pero algunas de ellas fueron susceptibles a TYLCV-Sar; mientras que las plantas con el gen *Ty-2*, no permitieron en absoluto la replicación de TYLCV-IL, pero cuando se inocularon con TYLCV-Sar, la mayoría de ellas estaban completamente infestadas y con síntomas severos del virus (Barbieri et al., 2010).

Piramidación de genes

La piramidación de genes de resistencia se define como la acumulación de genes favorables que afectan un carácter en un solo genotipo (Joshi & Nayak, 2010). Los materiales hasta ahora resistentes no suponen la solución definitiva al ataque del virus, debido a las altas presiones del inóculo; por lo que, se ha tenido como objetivo buscar un material que posea resistencia de amplio espectro a diferentes *Begomovirus*, mediante la combinación de dos o más de estos genes de resistencia de distinta procedencia (Pérez, 2007).

Inicialmente, muchos programas de mejoramiento generaron una resistencia vertical a partir de genes de resistencia mayores (genes *R*), provenientes de especies silvestres, actualmente, se sabe que los genes *R* están presentes en todos los tipos de resistencia, por lo que los cultivares pueden volverse nuevamente susceptibles en poco tiempo; por eso, ahora se busca generar una resistencia horizontal con combinación de genes mayores y menores, a esto se le ha llamado piramidación de genes y busca obtener resistencia más duradera (Rubio et al., 2016).

Según Prassana et al. (2015) y Rodríguez et al. (2017), depender de un solo gen de resistencia es una limitación, por lo que piramidar múltiples genes de resistencia *Ty* pueden mejorar el espectro, la durabilidad, la estabilidad y el nivel de resistencia o la tolerancia a diversas infecciones causadas por el complejo *Begomovirus - B. tabaci*. Cuando los genes de resistencia se encuentran piramidados, actúan en diferentes etapas del proceso infectivo y

según la especie viral presente; por lo que, solo si ocurriese una infección de varias mutaciones del virus simultáneamente, se quebraría dicha resistencia (Rodríguez et al., 2017).

Debido a la importancia del proceso de piramidación de genes, es necesaria la identificación de nuevos marcadores moleculares ligados a genes de resistencia *Ty*, con el fin de reducir el tiempo que se invierte en programas de mejora genética en identificación y combinación de más genes de resistencia, además de aumentar la velocidad de recuperación del fenotipo del padre recurrente en los retrocruzamientos (Kothe & Pereira, 1997; Pérez, 2007).

El uso de recursos biotecnológicos, mediante selección asistida por marcadores moleculares, ha sido fundamental en este programa de mejora, para determinar la presencia/ausencia de los genes de interés en los segmentos cromosómicos con los que están asociados los genes *Ty-1/Ty-3* y *Ty-2*: cromosoma 6 y 11, respectivamente (Bai et al., 2019). La selección asistida por marcadores tiene la ventaja que es relativamente simple y permite ahorrar recursos humanos y económicos. Sin esta alternativa, el tiempo de espera hasta poder observar las características fenotípicas puede ser de varios meses (incluso años dependiendo del cultivo) y requeriría mayor cantidad de horas en mano de obra para las labores de producción.

Detección del virus en Costa Rica

En la década de 1930 se detectó por primera vez en Israel el TYLCV, pero fue hasta el 2012 que se hicieron los primeros reportes de la cepa Israel en plantaciones comerciales de tomate en Costa Rica (Barboza et al., 2014). En ese momento la tasa infectiva no fue preocupante, como sí lo fue a finales del 2016, cuando el virus cobró importancia significativa en cuanto a la tasa infectiva y generó considerables pérdidas económicas. Ese año el porcentaje de incidencia del TYLCV incrementó a 41 % del total de muestras tomadas en evaluaciones a nivel nacional (Arroyo, 2017).

Hasta este momento, de las 28 variedades y 30 híbridos de semillas de tomate registradas en el país por el Sistema de Registro de Variedades de la Oficina Nacional de Semillas, las únicas semillas con procedencia 100% nacional son el híbrido Alteza Villa 768 y el híbrido Prodigio (López, 2016).

Según estudios realizados a finales del año 2016 con algunas de las principales variedades de tomate cultivadas en Costa Rica, se identificaron cuatro cultivares con tolerancia al virus, estos fueron Audaz, Colossus, TX-105 y 850591. Aunque la exposición de las plantas al virus se realizó en campo abierto, y no se realizó una inoculación directa utilizando moscas virulíferas o un clon infeccioso del TYLCV.

Prodigio: único híbrido nacional con resistencia a *Ralstonia solanacearum*

El 20 de septiembre de 2016, la Universidad de Costa Rica recibió el certificado de registro por parte de la ONS y se liberó por primera vez en el país el híbrido de tomate 100 % costarricense, F1 FBM 17-3, conocido como Prodigio (Goyenaga, 2016). Esta semilla está adaptada a las condiciones climáticas del país y brinda tolerancia ante la marchitez bacteriana, enfermedad causada por *R. solanacearum*. Tiene un fruto que presenta las características organolépticas solicitadas por el mercado nacional (fruto rojo, grande, con lóculos grandes y grados brix entre 4,0 y 5,0) y genera altos rendimientos en la producción (Goyenaga, 2016). Se ha demostrado que el híbrido Prodigio es competitivo en comparación con otros híbridos comerciales en cuanto a rendimiento y características del fruto (Campos et al., 2017). Sin embargo, ha tenido poca aceptación, debido a su susceptibilidad ante el TYLCV, esto conllevó a que Prodigio se enfrentara a un cambio dramático en las proyecciones de aceptación de consumo por parte de los productores (Echandi, C, Comunicación personal, 20 noviembre, 2020).

Búsqueda de rendimiento y calidad comercial

Según la literatura, la introgresión de genes de resistencia al TYLCV, durante el proceso de mejora genética, puede provocar la pérdida de otros genes o regiones cromosómicas de interés, induciendo cambios en las bases genéticas de cualidades fenotípicas como vida en anaquel, color, tamaño, firmeza y su comportamiento agronómico: calidad del fruto, rendimiento comercial y tolerancia a *R. solanacearum* (Caruso et al., 2015). Sin embargo, en investigaciones previas se ha encontrado que es muy común que accesiones de *S. chilense* pueden albergar más de un locus de resistencia al virus, por lo tanto, la resistencia puede estar mediada por una respuesta conjunta de diferentes genes, lo cual les da una gran ventaja competitiva (Yan et al., 2018).

La aceptación en el mercado nacional de un nuevo cultivar depende del efecto que pueda tener la piramidación de genes de resistencia sobre el rendimiento y la calidad comercial de los híbridos de tomate. Los productores nacionales comparan el rendimiento comercial de los híbridos actuales con tolerancia al TYLCV con los correspondientes a los híbridos originales susceptibles; por eso, se quiere determinar si es posible llegar a un balance entre una respuesta favorable de tolerancia, con una mínima pérdida del rendimiento comercial de frutos (Echandi, C, Comunicación personal, 20 noviembre, 2020). En un estudio comparativo acerca del comportamiento poscosecha de un cultivar con resistencia al TYLCV, se llegó a la conclusión de que la calidad organoléptica del fruto original fue recuperada a través de retrocruzas; sin embargo, el rendimiento disminuyó (Alonso et al., 2010), siendo esta una de las principales limitaciones de la piramidación de genes, ya que, si se incorporan genes de resistencia en un genotipo, el rendimiento agronómico del cultivar se podría ver limitado por los genes del parental donante utilizado (Kothe & Pereira, 1997). Por ese motivo, en la presente investigación, se comparó el rendimiento de los nuevos híbridos introgressados con genes *Ty*, con respecto al híbrido Prodigio que corresponde al parental recurrente al que se le introdujeron los genes de resistencia.

Metodología

Sitio experimental y delimitación temporal

La investigación se llevó a cabo durante la época seca del año 2020-2021 en un invernadero en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM), perteneciente a la Universidad de Costa Rica (UCR), localizada en La Garita de Alajuela, Costa Rica (10°00'26,48"N y 84°15'57,35" O) a una elevación de 851 msnm.

Para el establecimiento de la población de mosca blanca se dispuso de un invernadero de 2*2 m, anexo al laboratorio de Semillas de la EEAFBM, el mismo tiene una estructura de hierro galvanizado, cubierto de malla de nylon antiáfidos a los costados y cubierta de polietileno transparente tricapa de 200 µm en la parte superior y suelo cubierto con cemento.

Para el establecimiento del experimento se utilizó un invernadero del área de Hortalizas sin historial de producción, debido a la necesidad de contar con condiciones favorables para evitar la presión de plaga de mosca blanca en los híbridos a evaluar. Dicho invernadero posee las siguientes dimensiones: 30 m de largo, 10 m de ancho y 5 m de alto con luz natural. Su orientación es de oeste-este, posee una estructura de hierro galvanizado, con doble puerta para evitar la entrada de plagas, lavatorio y bandeja de desinfección de calzado para garantizar condiciones sanitarias adecuadas. El invernadero está completamente cubierto por malla de nylon antiáfidos en los costados, cubierta de polietileno transparente tricapa de 200 µm en la parte superior y el suelo cubierto con material *groundcover* de color blanco.

Material vegetal

El material vegetal se generó en el proyecto de investigación “Introgresión de genes de resistencia al Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) en el híbrido de tomate costarricense FBM 17-3” que se realiza en la EEAFBM y está inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Se utilizaron tres nuevos híbridos costarricenses de tomate, con genes de resistencia al TYLCV-IL, obtenidos a partir de cruces previos realizados como parte de un programa de retrocruzas entre líneas de Prodigio con la accesión premejorada de tomate AVTO1219 obtenida del *World Vegetable Center* (WorldVeg), anteriormente conocida como *Asian*

Vegetable Research and Development Center (AVRDC) en Taiwán, donante de los tres genes de resistencia *Ty-1/Ty-3* y *Ty-2*.

La investigación se compuso de cinco tratamientos, tres de ellos correspondieron a los nuevos híbridos costarricenses, mientras que los otros dos fueron un testigo susceptible y otro resistente (Cuadro 2).

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en el estudio de híbridos de tomate costarricenses introgresados con genes de resistencia al Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) *Ty-1/ Ty-3* y *Ty-2*.

Tratamiento	Descripción	Genes de resistencia	Exposición al TYLCV transmitido por <i>B. tabaci</i>
1	Híbrido con dos genes de resistencia	<i>Ty-1/Ty-3</i>	Sí
2	Híbrido con un gen de resistencia	<i>Ty-2</i>	Sí
3	Híbrido con tres genes de resistencia	<i>Ty-1/Ty-3</i> y <i>Ty-2</i>	Sí
4	Testigo susceptible*	No contiene	No
5	Testigo resistente**	<i>Ty-1/Ty-3</i>	Sí

*El testigo susceptible corresponde al híbrido Prodigio. **El testigo resistente corresponde a la semilla comercial importada “DRW-7810”, se le detectaron esos genes con el uso de marcadores moleculares específicos para ellos, pero no se descarta que pueda contener otros tipos de genes de resistencia.

Se utilizó el híbrido Prodigio como testigo, para poder comparar la posible pérdida en rendimiento con respecto en los nuevos híbridos piramidados que son derivados del mismo Prodigio. Se comparó el comportamiento agronómico y rendimiento comercial de frutos de ese híbrido, pero no se utilizó como parámetro para evaluar resistencia o tolerancia porque ya se conoce que es 100% susceptible. Para este caso, fue indispensable mantener un control preventivo y curativo del vector *B. tabaci* dentro del invernadero, para evitar la inoculación del virus en el híbrido susceptible.

Por su parte, el testigo resistente se utilizó para evaluar resistencia o tolerancia al virus y el rendimiento comercial de frutos respecto a las versiones de los nuevos híbridos con genes de resistencia. Se seleccionó el híbrido comercial importado DRW-7810 tolerante al

TYLCV-IL por ser el más vendido en el país al momento de realizar esta investigación (Monge, J, Comunicación personal, 03 agosto, 2020). Mediante marcadores moleculares específicos, se identificó la presencia de los genes *Ty-1/Ty-3* en el testigo, sin embargo, no se descarta que pueda contener otros tipos de genes de resistencia para los cuales no se tienen los marcadores. En el cuadro 1 se señalan los genes *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3* que fueron introgresados en los híbridos de tomate de esta investigación, su procedencia, ubicación en el cromosoma y patrón de herencia.

Cuadro 2. Procedencia de los genes *Ty* empleados en la investigación para la introgresión de resistencia en tomate para mesa *S. lycopersicum*.

Gen de resistencia	Especie de procedencia	Ubicación	Patrón de herencia
<i>Ty-1</i>	<i>Solanum chilense</i>	Cromosoma 6	Dominante
<i>Ty-2</i>	<i>Solanum habrochaites</i>	Cromosoma 11	Dominante
<i>Ty-3</i>	<i>Solanum chilense</i>	Cromosoma 6	Dominante
<i>Ty-4</i>	<i>Solanum chilense</i>	Cromosoma 3	Dominante incompleto
<i>Ty-5</i>	<i>Solanum peruvianum</i>	Cromosoma 4	Recesivo
<i>Tcm-1</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Se desconoce	Recesivo

Adaptado de Dueñas et al. (2011) & Yan et al. (2021)

Preparación de almácigo de tomate

El almácigo de los cinco tratamientos se realizó en bandejas plásticas de polipropileno de 128 celdas utilizando como sustrato 100 % *peat moss* y manejo de la humedad a capacidad de campo, la semilla se sembró a la misma profundidad de su tamaño (aproximadamente 0,5 cm de profundidad). Posteriormente, las bandejas se conservaron en un cuarto oscuro durante cuatro días para acelerar y homogeneizar el proceso de germinación, tomando en cuenta que la temperatura mínima y máxima para su germinación es de 10-35 °C, respectivamente, con una temperatura óptima entre 20-25 °C (Ramos, 2015).

Pasados los cuatro días en oscuridad, las bandejas se trasladaron a un invernadero exclusivo para el desarrollo y manejo de almácigos, donde se mantuvo por cuatro semanas. Una vez ahí el almácigo se mantuvo con riegos cortos por aspersión de 1 min, con una frecuencia de 15 min desde las 6:00am hasta las 4:00pm. En la semana uno, se aplicó en dos ocasiones $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de la fórmula de fertilizante soluble alto en fósforo 10-30-10, con el fin de favorecer su desarrollo; en la semana dos se aplicó un día $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fertilizantes solubles 13-60-0 y otro $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 20-20-20; de la semana tres en adelante (hasta el trasplante), se aplicó $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 20-20-20 dos veces por semana.

Protocolo para el establecimiento del pie de cría de mosca blanca (*Bemisia tabaci*)

El pie de cría de *B. tabaci* se realizó siguiendo el protocolo establecido por Díez, M. J., (comunicación personal, 4 de setiembre de 2020). Los individuos virulíferos de *B. tabaci* del biotipo Q fueron aportados por el Laboratorio de Biología Molecular de Virus y Plantas del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la UCR. Las moscas blancas se alimentaron de plántulas jóvenes y sanas de tomate, durante dos semanas, con la finalidad de aumentar el número de individuos de la población. Para ello se utilizaron cinco plantas del híbrido Prodigio provenientes de la EEAFBM en sustrato *peat moss*; estas plantas no fueron parte de los tratamientos.

Tanto las plantas como las moscas se introdujeron en un ambiente controlado de 2*2 m completamente cerrado con malla antiáfidos que se dispuso para este fin. La velocidad de reproducción de la población varía dependiendo de la temperatura, la humedad relativa y la intensidad lumínica en la jaula (lo ideal es una temperatura de 28 °C, 30-50 % de humedad relativa y un fotoperiodo de 14 horas) (Polson & Capobianco, 2013).

Inoculación del virus TYLCV usando el vector mosca blanca (*Bemisia tabaci*)

Cuando las plántulas de tomate correspondientes a los tratamientos 1, 2, 3 y 5 alcanzaron aproximadamente las cuatro semanas de edad a los 25 días después de la siembra (DDS), con 4-5 hojas verdaderas, fueron expuestas a la mosca blanca portadora del TYLCV-IL.

La exposición a la mosca blanca e inoculación del virus, se realizó introduciendo las bandejas de los almácigos al ambiente controlado de 2*2 m donde previamente se encontraban las plantas de Prodigio utilizadas para aumentar la población de mosca blanca.

Las plantas enfermas con el vector, se colocaron cerca de las paredes del ambiente controlado, rodeando a las bandejas recién ingresadas. Las bandejas se dejaron en este espacio durante un periodo de adquisición del virus por 48 h, tiempo suficiente para que las moscas se alimentaran de las plantas más jóvenes e inocularan el virus en el floema (Bernal, 2010).

Para asegurarse de la dispersión de *B. tabaci* por las plántulas de los cuatro tratamientos a inocular, se dieron suaves golpes en las hojas o se giraron algunas de ellas (dejando el envés expuesto hacia arriba) con el fin de que los adultos volaran y se dispersaran por todo el espacio, buscando el envés de las plantas nuevas (esto dado que el envés es la zona de la hoja donde suelen agruparse los individuos para alimentarse y reproducirse) (Polson & Capobianco, 2013), esta práctica de dispersión se realizó en repetidas ocasiones durante el periodo de adquisición del virus.

Establecimiento de las plantas bajo condiciones controladas en invernadero

Posterior a las 48 horas de inoculación en ambiente controlado, se realizó una aplicación con un insecticida que contuviera el ingrediente activo Imidacloprid utilizando la dosis recomendada de 400 L·ha⁻¹ para eliminar la población de mosca blanca presente en el almácigo. También se realizó una inspección 24 horas posterior a la aplicación con el fin de asegurar la no presencia del adulto de mosca blanca, larvas o huevos en el envés de las hojas.

Las bandejas se trasladaron al invernadero, se sumergieron en una solución biogeneradora radicular cuyo ingrediente activo incluye auxinas, vitaminas, citocininas y fósforo asimilable a la dosis recomendada para tomate de 1 L·ha⁻¹, para estimular el crecimiento de la raíz y la capacidad de absorción de nutrientes y agua.

Una vez sumergidas las bandejas en el enraizador, las plantas se trasplantaron en bolsas negras de 16 L con un sustrato inerte de fibra de coco, humedecido una semana antes del trasplante con agua para lavar posibles sales acumuladas en el medio y dos días antes humedecido con las soluciones nutritivas mediante fertirriego. Se sembró una planta por bolsa y estas a su vez se colocaron distribuidas en seis hileras, cada hilera se colocó a 1,6 m de la otra y la distancia entre cada bolsa en una misma hilera fue de 0,5 m. Dos de esas bolsas por hilera correspondieron a bordes, los cuales no fueron inoculados. En la Figura 1 se muestra la disposición de las bolsas en el invernadero.



Figura 1. Plantas de tomate trasplantadas en el invernadero, posterior a su inoculación con el virus TYLCV-IL en bolsas negras de 16 L con sustrato inerte de fibra de coco. El riego y la nutrición fueron aportados mediante fertirriego con dos goteros por bolsa (las hileras de los costados norte y sur del invernadero corresponden a bordes).

Para el sistema de riego se colocaron cintas de goteo con dos microtubos distribuidores tipo “espagueti” por planta. Para verificar una correcta distribución del caudal hasta el final de las cintas de goteo, se calculó el Coeficiente de Uniformidad de Christiansen (CU) colocando recipientes en la salida de 24 goteros distribuidos en forma de “X” por toda el área experimental y se midió el volumen de agua regado durante tres minutos. El valor teórico de caudal de los goteros es de 4 L/h, por lo tanto, el caudal real de los goteros se mantuvo dentro de un rango normal de variación, en este caso, se obtuvo un CU del 97,9 % y se considera “excelente” al ser superior al 94 % según Ávila et al., 1996 (Figura 2).

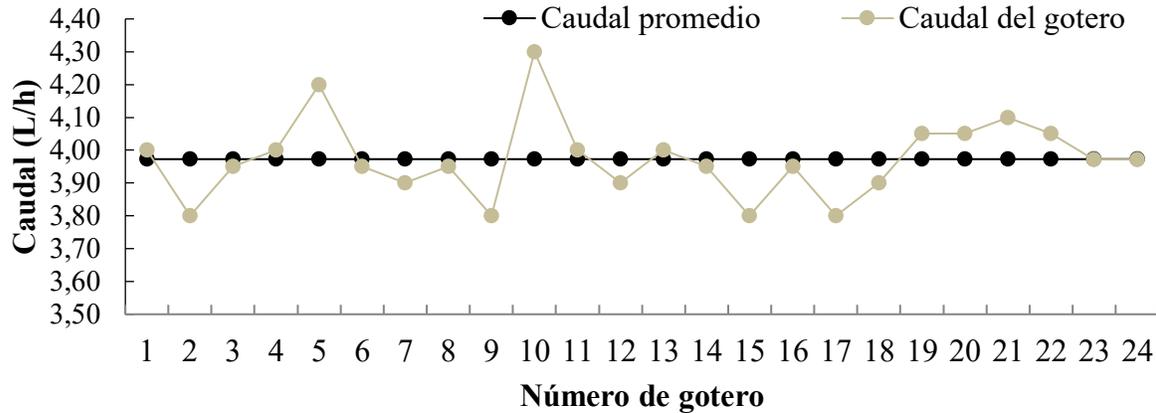


Figura 2. Distribución del caudal por gotero muestreado.

La nutrición del cultivo se aportó mediante fertirriego. Para ello se utilizaron cuatro soluciones nutritivas según la etapa fenológica del cultivo: establecimiento, desarrollo vegetativo, floración- inicio llenado de fruto, llenado de fruto (producción). Las concentraciones de elementos (ppm) que se utilizaron según cada etapa fenológica fueron las planteadas por Huertas (2019) que las desarrolló en condiciones similares a las de esta investigación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones de elementos (ppm) utilizadas según cada etapa fenológica del cultivo.

Etapa fenológica	Duración (semanas)	Elemento (ppm)											
		Ca	K	Mg	N	S	P	B	Mn	Fe	Cu	Zn	Mo
Establecimiento	2	124	156	32	110	52	40	0,5	0,8	1,1	0,2	0,2	0,1
Desarrollo vegetativo	3	153	195	41	138	69	50	0,5	0,8	1,1	0,2	0,2	0,1
Floración/inicio llenado de fruto	4	162	242	53	152	99	44	0,5	0,8	1,1	0,2	0,2	0,1
Llenado de fruto (producción)	6	162	221	48	149	83	50	0,5	0,8	1,1	0,2	0,2	0,1

Se contó con dos tanques de almacenamiento de 450 L cada uno para la preparación de soluciones madre y aplicación de soluciones nutritivas al cultivo. Las soluciones madre se diluyeron a una concentración de 1:25, mediante una mesa de inyección de la línea MixRite de TEFEN[®], constituidas por una línea de bombas dosificadoras proporcionales operadas por agua, para asegurar la inyección precisa de los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo del cultivo. El control de las aplicaciones fue regulado por un timer X-Core de Hunter[®].

La necesidad de riego del cultivo se definió por el consumo de agua de la planta durante la evapotranspiración y se calculó el porcentaje de drenaje, el cual se limitó a 20 %; con esto se buscó un valor de drenaje no tan bajo para que se diera un lavado adecuado y evitar la saturación de sales en la parte radical de las plantas, pero no tan alto para evitar la lixiviación de nutrientes o el desperdicio de agua. Para calcular el porcentaje de drenaje se colocaron bandejas para medir el volumen de solución drenada en un periodo de 24 horas y se utilizó la fórmula (Ecuación 1) propuesta por Soto (2015).

$$\text{[ecuación 1]} \quad \% \text{ drenaje} = \frac{\text{volumen de solución drenada}}{\text{volumen de solución aplicada}} * 100$$

La temperatura y humedad relativa interna del invernadero se monitorearon diariamente, a cada hora del día, con el uso de un Data Logger marca HOBOWare[®] (Anexo 8).

Se realizaron monitoreos semanales de otras enfermedades y plagas comunes en el cultivo (*Tuta* sp., ácaros, trips, enfermedades de suelo como marchitez bacteriana y *Fusarium* y enfermedades foliares como mildiú polvoso y tizón tardío), para dar un adecuado mantenimiento a través de su ciclo y conseguir valores reales de rendimiento.

Se realizaron labores culturales para la producción del cultivo: resiembra de plantas perdidas, podas a dos ejes, amarre y deshija, aplicaciones preventivas de productos

fitosanitarios para evitar la aparición de los principales plagas y enfermedades del tomate y productos estimulantes para su crecimiento. A los 77 días después de trasplante (DDT) se realizó la primera cosecha. Las cosechas se realizaron dos veces por semana, durante un periodo de 14 semanas.

Método de detección del virus en campo

Con el fin de detectar la presencia del virus en tejidos foliares, se colectaron muestras de hojas jóvenes de los meristemos apicales de plantas seleccionadas. En el primer muestreo, realizado a los 30 DDT, se seleccionaron 90 plantas dentro de toda el área de estudio con y sin síntomas visuales de TYLCV-IL. El segundo muestreo se realizó a los 160 DDT, en esta ocasión se muestrearon 95 plantas, siguiendo el mismo método de selección.

Una hoja de cada planta inoculada fue llevada al CIBCM, donde los encargados del Laboratorio de Biología Molecular de Virus y Plantas realizaron una extracción de ácidos nucleicos totales, para ser procesados mediante la técnica de hibridación molecular conocida como *Dot blot*, en la cual se utiliza una sonda específica que hibrida un segmento del genoma que se localiza en la región intergénica del virus para la detección y localización de secuencias específicas de ADN (Hernández, E., comunicación personal, 16 de noviembre, 2020).

Una hoja de cada planta inoculada también se procesó en el Laboratorio de Biología Molecular de la EEAFBM, para realizar una extracción de ADN utilizando el protocolo establecido por Dellaporta et al. (1983) modificado con las condiciones de amplificación de Park et al. (2014). Se realizó una reacción en cadena polimerasa (PCR) punto final (según las especificaciones del fabricante Qiagen para el kit TopTaq™) utilizando el imprimador específico para la especie viral: (*forward primer* IRTyKrF) 5'-TTT CCT GAA TCT GTT CAC GGA TT-3' y (*reverse primer* IRTyKrR) 5'-AAC TAA TGC CTG TTC CTT CAT TC-3' (Park et al., 2014). Los PCR se realizaron en un termociclador SimpliAmp™, donde se programó un primer ciclo de 3 min a 94 °C, treinta ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C y un último ciclo de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa con una concentración al 2 %, se utilizó un amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE) a una concentración de 1x. El objetivo de realizar dos métodos distintos: PCR e hibridación con sondas, fue asegurar los resultados obtenidos.

Control del vector en campo

Una vez establecidos los tratamientos dentro del invernadero, se mantuvo durante todo el ciclo del cultivo un rol de aplicaciones preventivas y curativas contra *B. tabaci*, rotando insecticidas con distintos ingredientes activos como Spiromesifen, Imidacloprid, Avermectina y Piriproxyfen, y distintos modos de acción, considerando un umbral de acción entre 0-10 individuos por trampa amarilla para el uso de insecticidas curativos. Durante todo el periodo se realizó conteos de individuos en trampas amarillas distribuidas aleatoriamente por el invernadero; el manejo fue efectivo, ya que nunca se superó el umbral establecido. El objetivo fue evitar la transmisión del virus al testigo susceptible.

Evaluación de la incidencia y severidad del TYLCV-IL

A partir del día 21 DDT de las plantas en el invernadero, se realizaron evaluaciones semanales para determinar la incidencia y el índice de severidad de la enfermedad de acuerdo con la escala descrita por Lapidot y Friedmann (2002) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Escala numérica (0-4) y descriptiva de los síntomas para evaluar la severidad de Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) en las plantas (Ver anexo 2).

Escala	Descripción de los síntomas
0	Sin síntomas.
1	Leve amarillamiento en márgenes de folíolos apicales.
2	Leve amarillamiento y encrespamiento de folíolos apicales.
3	Alrededor del 50% de amarillamiento en folíolos, encrespamiento y acucharamiento, con leve reducción de tamaño, pero sin detener el crecimiento de la planta.
4	Severo amarillamiento en folíolos, encrespamiento y acucharamiento de hojas, con retraso y detenimiento del crecimiento de la planta.

Esta evaluación se complementó con la escala visual empleada por Lapidot y Friedmann (2002) y que se encuentra en el Anexo 2.

El porcentaje de incidencia se calculó a partir del promedio del área bajo la curva de los datos obtenidos al utilizar la escala visual de la enfermedad (Anexo 2) de Lapidot y Friedmann (2002) durante las catorce fechas de evaluaciones. Mientras que el índice de severidad se calculó con la Ecuación 2 del índice de severidad de la enfermedad (Huang et al., 2012).

$$IS = \frac{\sum Ni * Ri}{(N * Rh)} * 100$$

[ecuación 2]

Donde:

- ***Ni*** es el número de plantas en cada categoría de la escala de síntomas de la enfermedad.
- ***Ri*** es la clasificación de los síntomas en la escala de la enfermedad (0–4).
- ***N*** es el número total de plantas por tratamiento.
- ***Rh*** es el valor más alto en la escala de síntomas de la enfermedad (4).

Evaluación agronómica

Se realizó la categorización de frutos según el decreto del MEIC-MAG del 2004 en frutos de 1°, 2°, 3° calidad y frutos de rechazo (deformes y/o enfermos). Todos los frutos de cualquier categoría debieron cumplir los requisitos mínimos de calidad: estar bien formados, enteros y sanos, tener consistencia firme y compacta, estar limpios, exentos de malos olores y sabores extraños, exentos de humedad externa anormal; los que no cumplieron estos requisitos se consideraron frutos de rechazo (MEIC-MAG, 20 de julio de 2004).

Los frutos debieron cumplir los requisitos mínimos y no sobrepasar los porcentajes máximos de defectos permitidos para cada categoría. El rendimiento del cultivo se clasificó en tres categorías en base a la norma de calidad de frutos de tomate según el decreto del MEIC-MAG, en el que: primera calidad ≥ 190 -250 g con un diámetro mayor o igual a 8 cm, segunda calidad ≥ 140 -190 g con diámetro entre 6-8 cm, tercera calidad < 140 g entre 4-6 cm. Además, se clasificaron frutos deformes y enfermos (MEIC-MAG, 20 de julio de 2004).

Las evaluaciones agronómicas iniciaron a los 15 DDT. Para determinar el crecimiento fenológico de las plantas se tomaron dos repeticiones por tratamiento semanalmente. Las mediciones se llevaron a cabo hasta los 78 DDT, por la dificultad para seguir con las mediciones debido al tamaño de las plantas y también porque dieron inicio las evaluaciones poscosecha.

- Altura de la planta (cm): se midió las distancias entre la base del tallo hasta el ápice de la planta, con ayuda de una cinta métrica.
- Diámetro del tallo en la zona basal (cm): se midió el diámetro en la altura de la base del tallo, con ayuda de un vernier digital (también conocido como calibrador, calíper o pie de rey).
- Altura del primer racimo (cm): se midió la distancia entre la base del tallo hasta el brote axilar del primer racimo, con ayuda de una cinta métrica.
- Distancia entre el primer y el segundo racimo (cm): se midió la distancia entre el brote axilar del primer racimo, hasta el brote axilar del segundo, con ayuda de una cinta métrica.

Entrenudos cortos entre el 1° y 2° racimo en los cultivares, suele ser un indicador de que habrá mayor cantidad de puntos de crecimiento de racimos y, por lo tanto, más frutos por planta. Por eso se realizó la siguiente evaluación reproductiva:

- Número de frutos en el primer y segundo racimo: se contó manualmente el número de frutos en el primer y segundo racimo.

A los 78 DDT (primera cosecha) se realizó una evaluación poscosecha para cuantificar el rendimiento y calidad del fruto. La segunda evaluación poscosecha se realizó a los 156 DDT (antepenúltima cosecha). Ambas evaluaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Semillas de la EEAFBM. Se cuantificó:

- Número de frutos totales por parcela: se contabilizó el número de frutos por parcela de la cosecha de ese día.
- Peso de frutos (g): se utilizó una balanza digital.
- Tamaño de cicatriz apical (cm²): medida digitalmente con el Software ImageJ.

- Firmeza, para lo cual se utilizó un penetrómetro *Manual test stand* DIGITAL FORCE GAUGE[®], modelo HPA.
- Alto y ancho de frutos: se midió con ayuda de un vernier digital.
- Número de lóculos: se partió el fruto por la mitad y se contó el número de lóculos en una de las mitades.
- Grados brix: medidos con un refractómetro HI 96801 marca HANNA[®].

Diseño experimental

Se estableció un diseño irrestricto al azar, el cual constó de cinco tratamientos con cuatro repeticiones (20 unidades experimentales). Cada repetición constó de 10 plantas por unidad experimental, para un total de 40 plantas por híbrido y 200 plantas en total; en el invernadero había 336 plantas en total, pero 136 de ellas correspondían a bordes. Los tratamientos con sus repeticiones estuvieron ubicados en cuatro hileras de manera aleatorizada (Anexo 1).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con el Software InfoStat[®], mediante el método de contrastes ortogonales descritos en el cuadro 6. Para cada hipótesis se utilizó un nivel de significancia de 0,05, siempre y cuando se cumplieran los supuestos de homogeneidad de varianzas entre los tratamientos, así como normalidad en la distribución de los errores del modelo.

En vista de que las variables de respuesta que midieron la tolerancia al virus no se ajustaron a una distribución normal de probabilidad, se recurrió al empleo de un análisis de área bajo la curva para ajustar los errores entre las repeticiones de un mismo tratamiento.

Resultados y discusión

Tolerancia al TYLCV

Dentro de las variables que midieron la tolerancia al TYLCV se encuentra la incidencia de plantas con síntomas virales (%). En la figura 3 se observa que el T1 (introgresión de genes *Ty1/Ty3*) fue el único que obtuvo diferencias altamente significativas con respecto al testigo T5 y al resto de los tratamientos con el gen *Ty-2* que sí fueron inoculados. La incidencia de plantas con síntomas virales (%) durante la totalidad del período experimental para el T4 (testigo susceptible) se mantuvo prácticamente en niveles que no sobrepasaron el 5 %, lo que reveló un control efectivo del vector dentro del invernadero. De igual manera, el tratamiento 4 no tuvo mayor incidencia del virus con respecto aquellos que sí fueron inoculados y presentaron el gen *Ty2*.

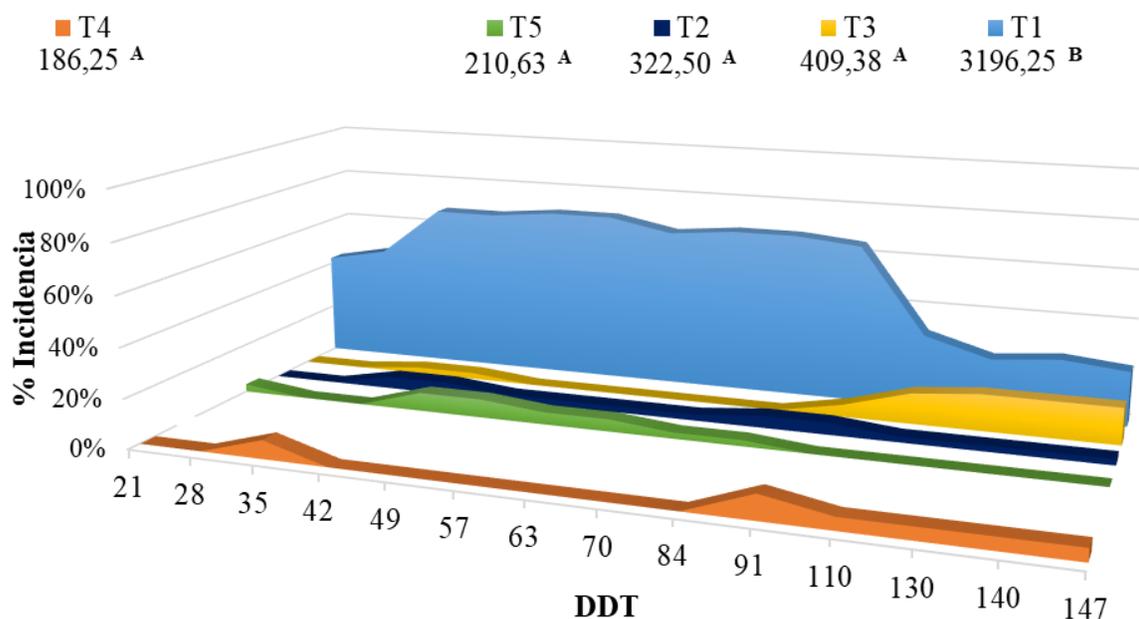


Figura 3. Área bajo la curva de la incidencia para cada tratamiento, a través de las 14 evaluaciones semanales. T1 corresponde al tratamiento con los genes *Ty-1/Ty-3*, T2 corresponde al tratamiento con el gen *Ty-2*, T3 corresponde al tratamiento con los genes *Ty-1/Ty-3/Ty-2* y T5 es el testigo resistente. (T4 corresponde al testigo susceptible, el cual no se tomó en cuenta para el análisis estadístico). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

Según se muestra en la figura 3, el T1 que contiene los genes *Ty-1/Ty-3* presentó sostenidamente por un período prolongado hasta un 70% de incidencia del virus en las plantas muestreadas. Mientras que los tratamientos T2 y T3, únicamente durante algunos muestreos, alcanzaron niveles por debajo de la línea del 20% de incidencia.

El porcentaje de severidad correspondiente para cada tratamiento se presenta en el cuadro 5. De igual forma, el único tratamiento que presentó diferencias significativas fue el T1, con un porcentaje de severidad de un 20,5%.

Cuadro 5. Porcentajes de severidad (IS) de los cuatro tratamientos utilizados para evaluar la tolerancia en los híbridos experimentales. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según la prueba de LSD Fisher, realizada mediante un Modelo Lineal Generalizado Mixto.

Tratamiento	Descripción	Genes	IS (%)
1	Híbrido con dos genes de resistencia	<i>Ty-1/Ty-3</i>	20,5 ^a
2	Híbrido con un gen de resistencia	<i>Ty-2</i>	1,0 ^b
3	Híbrido con tres genes de resistencia	<i>Ty-1/Ty-3, Ty-2</i>	1,5 ^b
5	Testigo resistente	<i>Ty-1/Ty-3</i>	0,5 ^b

En la figura 4, se representan estos mismos valores de severidad, pero podemos verlos a través del tiempo, se observa que la severidad tiende a ser menor conforme la planta va creciendo, lo cual es un comportamiento común de este virus en particular, sin embargo, podría investigarse también si la disminución del IS representa la recuperación de la planta a la infección del virus por efecto de la participación de los genes de tolerancia introgradados.

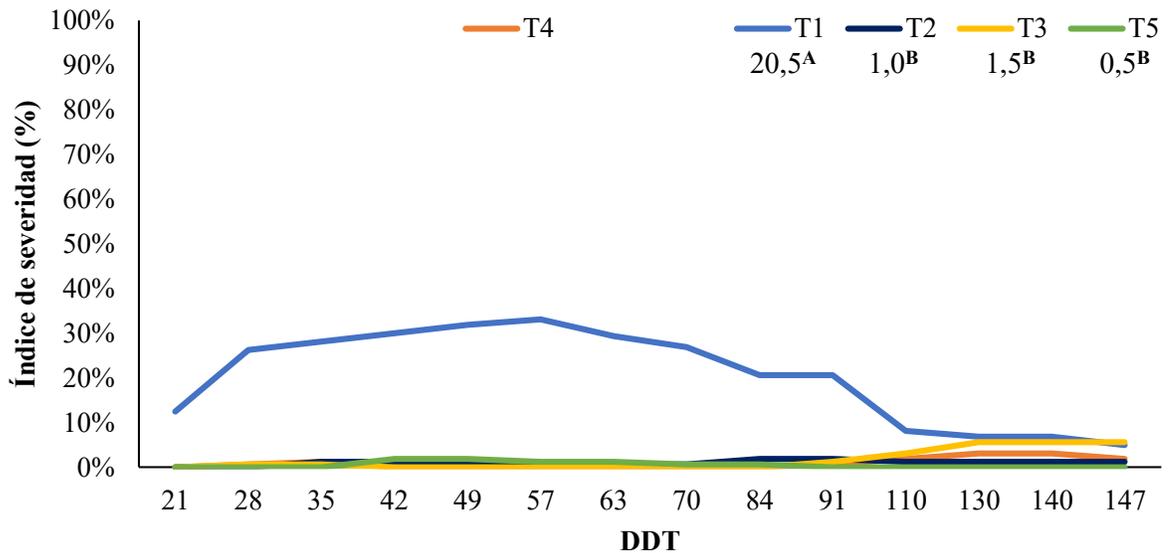


Figura 4. Porcentaje del índice de severidad (%) de los tratamientos a través de 14 evaluaciones semanales. T1 corresponde al tratamiento con los genes *Ty-1/Ty-3*, T2 corresponde al tratamiento con el gen *Ty-2*, T3 corresponde al tratamiento con los genes *Ty-1/Ty-3/Ty-2* y T5 es el testigo resistente. (T4 corresponde al testigo susceptible, el cual no se tomó en cuenta para el análisis estadístico). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

Ya que el testigo resistente es una variedad comercial, no se cuenta con la información suficiente sobre su genotipo y por lo tanto no se tiene claro cuáles genes de resistencia contiene.

En el Laboratorio de Biología Molecular de la EEAFBM se contrastaron algunas muestras con marcadores moleculares específicos para los genes de resistencia utilizados en esta investigación, se detectaron los genes *Ty-1/Ty-3*, pero existe la posibilidad que además de contener *Ty-1/Ty-3*, posea otros genes de resistencia al virus de los cuales no se tengan los marcadores adecuados para identificarlos en el laboratorio.

Otro punto que también es importante recalcar, es que aunque los datos de incidencia y severidad del tratamiento 4 no se tomaron en cuenta para el análisis estadístico, mantuvo

valores de I y IS similares al tratamiento 5; tomando en consideración que este híbrido es 100% susceptible al TYLCV y que no se inoculó con el virus, se interpreta que el control del vector dentro del invernadero fue exitoso, de modo que el tratamiento 4 permaneció sin infección de virus y permitió manifestar su potencial genético de rendimiento de frutos sin sesgo alguno.

Para complementar los datos anteriores, se presentan los resultados de análisis de contrastes planteados para el primer objetivo de esta investigación (Cuadro 6). La información que se deduce de ellos es la siguiente.

1. En el contraste 1 se compararon las medias del testigo resistente con las de todos los híbridos experimentales. Se obtuvo un p-valor de 0,0131, el cual demuestra que sí existen diferencias significativas entre el testigo y los demás tratamientos, obteniéndose un desvío de medias levemente negativo. Esto indica que el promedio de la suma de datos de los tratamientos 1, 2 y 3 no ofrecen tanta resistencia como el testigo.
2. En el contraste 2 se compararon las medias del tratamiento con un solo gen (tratamiento 2) con las de los tratamientos con dos (tratamiento 1) y tres genes (tratamiento 3). Se obtuvo un p-valor de 0,0016, indicando diferencias significativas entre tratamientos, con un desvío de las medias negativo. Por lo tanto, el tratamiento 2 resulta ser más tolerante que el 1 y 3. Se descarta la hipótesis nula de esta investigación, la cual dice que entre más cantidad de genes de resistencia posea una variedad (piramidación de genes) mayor tolerancia al virus se obtiene.
2. En el contraste 3 se compararon los híbridos de los tratamientos 1 en el cual está ausente el gen *Ty-2*, contra el tratamiento 3, en el cual sí está presente el gen *Ty-2*. El p-valor obtenido es >0.0001 , lo cual indica que es un resultado altamente significativo. Al obtenerse un desvío de las medias positivo, se puede concluir que el tratamiento 3 es más tolerante al virus en comparación con el tratamiento 1, debido a la presencia del gen *Ty-2*.

Cuadro 6. Resultado de los contrastes que indican diferencias en el índice de severidad (%) entre tratamientos. Realizado a través de la prueba de contrastes, con un valor de significancia de 0.05.

Contraste	Tratamientos del contraste	Genes de resistencia en cada contraste	p- valor
1	5 vs 1+2+3	Testigo resistente vs <i>Ty-1/Ty-3</i> + <i>Ty-2</i> + <i>Ty-1/Ty-3</i> y <i>Ty-2</i>	0,0131
2	2 vs 1 + 3	<i>Ty-2</i> vs <i>Ty-1/Ty-3</i> + <i>Ty-1/Ty-3</i> y <i>Ty-2</i>	0,0016
3	1 vs 3	<i>Ty-1/Ty-3</i> vs <i>Ty-1/Ty-3</i> y <i>Ty-2</i>	<0,0001

Los resultados obtenidos mediante el análisis molecular para las variables de incidencia y severidad confirmaron los valores obtenidos mediante la categorización visual de los síntomas en plantas sintomáticas; por lo tanto, esto confirma que el uso de la escala visual da resultados confiables y facilita el estudio de los síntomas de esta cepa de TYLCV en específico. Lo anterior es relevante cuando no existen recursos económicos suficientes para un diagnóstico con una hibridación con sondas o PCR. Sin embargo, debe tenerse cuidado, pues en plantas no sintomáticas evidentemente no se puede detectar la presencia de virus mediante la escala visual, pero sí se puede detectar la presencia del virus en PCR e hibridación por sondas (Cuadro 7), tal como ocurrió en el caso del tratamiento 5 que no mostró síntomas en campo.

Cuadro 7. Resultado de hibridación y PCR para la primera (30 DDS) y segunda evaluación (161 DDS) para cada uno de los tratamientos. El texto marcado en rojo indica los resultados que no fueron concordantes entre hibridación y PCR.

Evaluación	Tratamiento	Resultado de hibridación	Resultados PCR
1	T1	100% Positivo	100% Positivo
	T2	100% Negativo	100% Positivo*
	T3	100% Negativo	100% Positivo*
	T5	100% Positivo	100% Positivo
2	T1	100% Positivo	87,5% Positivo 12,5% Negativo
	T2	67% Negativo	67% Negativo
		33% Positivo*	33% Positivo
	T3	33% Negativo	67% Negativo
		67% Positivo*	33% Positivo*
T5	80% Positivo	80% Positivo* 20% Negativo	

* En algunos tratamientos se reportan muestras positivas a la presencia de virus, aunque la cantidad de ADN viral detectado se encuentra muy cerca del límite de detección del ensayo.

En el método de detección visual de síntomas de la enfermedad, el tratamiento con más plantas con síntomas claros de TYLCV fue el T1. Los demás tratamientos se mantuvieron prácticamente sin síntomas o con muy pocos. Sin embargo, para confirmar los datos observados en campo mediante la escala visual de severidad, se realizaron dos tipos de análisis en laboratorio: hibridación “Dot blot” con sondas específicas y un PCR; ambos análisis se realizaron en dos fechas, la primera fue a los 30 DDT y la segunda a los 161 DDT.

En la primera hibridación “Dot blot” con sondas específicas se obtuvo que de las 90 muestras de tejido foliar tomadas a los 30 DDT, 41 de ellas dieron positivas a la presencia del virus, pero sólo 19 de ellas presentaron claros síntomas de la enfermedad en campo. Mientras que, en la segunda hibridación se obtuvo que de las 95 muestras de tejido foliar 54 de ellas resultaron positivas a la presencia del virus, pero sólo 19 de ellas presentaron claros síntomas de la enfermedad en campo. Acá se detectó que el T5 a pesar de no presentar síntomas en campo, sí presenta un 80% de ADN viral en su sistema, sin embargo, no llegó a expresar los síntomas.

Hasta ahora, el principal enfoque en programas de mejoramiento han sido las introgresiones de los genes *Ty-1*, *Ty-2*, y *Ty-3* en el tomate cultivado (Yan et al., 2018). Algunos artículos resumen los resultados de los esfuerzos previos de la identificación, selección y uso de diferentes recursos genéticos en el mejoramiento de tomate por introgresión de genes de accesiones silvestres de tomate.

El tratamiento que representó una mayor severidad en esta investigación, fue el T1 que contiene los genes *Ty-1/Ty-3*, el gen *Ty-1* fue el primero asociado con la tolerancia al TYLC, mediante la inhibición de los síntomas virales, interfiriendo en las funciones de la proteína responsable del movimiento del virus en el hospedero. Ha sido el gen más expuesto a distintas cepas del virus y, por lo tanto, puede que posea un amplio espectro de resistencia, pero se ha comprobado que es más eficiente si las concentraciones virales son bajas (Dueñas, 2012). Lo anterior permite confirmar que la resistencia mediada por *Ty-1* no es adecuada para usar bajo una alta presión de la enfermedad, ya que conduce a la ruptura de la resistencia en algunos casos (Yan et al., 2018).

Además, se discute la eficiencia y durabilidad del mecanismo de defensa antiviral de los cultivares con el gen *Ty-1*, debido a que el mecanismo se da mediante el aumento de metilación de la citosina de los genomas virales, generando un silenciamiento transcripcional de genes eucarióticos que resulta en la inactivación del virus. Sin embargo, la resistencia al virus se puede ver comprometida si ocurre una infección mixta de TYLCV con el virus del mosaico del pepino (Cucumber mosaic virus, CMV) (Butterbach et al., 2014).

La resistencia asociada al gen *Ty-3*, está relacionada con los eventos del tropismo viral, en los cuales, a pesar de detectarse concentraciones virales aun estando el gen presente el virus no llega a replicarse de la misma manera como sí lo haría en un cultivar susceptible. Este gen muestra un espectro amplio de tolerancia ante especies diferentes de begomovirus (Dueñas, 2012).

En esta investigación se obtuvo que la tolerancia conferida por el gen *Ty-2*, es más fuerte que la conferida con los genes *Ty-1* y *Ty-3*, esto puede estar relacionado con el mecanismo de inactivación de replicación viral (Dueñas, 2012). Se ha demostrado, mediante evaluaciones a poblaciones de plantas segregantes de ciertos cultivares que poseen el gen *Ty-2*, que posee una herencia dominante para la resistencia al TYLCV, incluso, el gen *Ty-2* ha

sido declarado en Cuba el primer gen de inmunidad natural frente a un aislado de TYLCV, pues sus plantas no presentaron ningún síntoma de la enfermedad (Dueñas, 2012).

Boiteaux et al., (2007) probaron un conjunto de líneas endogámicas, portadoras del gen *Ty-2* en condición homocigota, inoculadas con un begomovirus; los resultados de sus ensayos oscilaron entre una respuesta inmune ante el TYLCV, hasta una ligera clorosis venal, sin síntomas severos de la enfermedad.

El análisis por hibridación de ácidos nucleicos realizado por Dueñas et al., (2008) mostró que en las accesiones portadoras del gen *Ty-2* no ocurrió replicación del ADN viral durante el periodo de evaluación. En esta tesis, para este tratamiento, se obtuvo en la primera evaluación un 100% plantas sin virus y en la segunda, un 67% plantas sin virus y 33% plantas con virus, pero ese 33% corresponde a una baja carga viral.

La mayoría de los estudios preliminares, indican que cultivares con el gen *Ty-2* ofrecen ventajas en el mejoramiento genético para la tolerancia al TYLCV, debido a su herencia dominante parcial en los genotipos heterocigotos, presentan valores de tolerancia casi tan altos como los genotipos homocigotos resistentes, por lo tanto, puede representar una tolerancia de amplio espectro por mucho más tiempo (Dueñas, 2012). Los híbridos en estudio son heterocigotos para el gen *Ty-2*, y los resultados confirman que no existen diferencias significativas con el testigo T5 en cuanto a la tolerancia al TYLCV.

Se cree que el gen *Ty-2* confiere tolerancia a diversas cepas de TYLCV en el mundo, como las del norte de Vietnam, sur de la India, Israel, Taiwán, el norte de la India, Filipinas y Tailandia, pero no a la cepa Sardinia (TYLCV-Sar), conocida como Cerdeña (Dueñas, 2012). Otros estudios también mencionan que la resistencia puede ser superada por el Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) (Yan et al., 2018). Por lo tanto, este es un dato importante si se buscan cultivares con resistencia de alto espectro, ya que en Costa Rica está presente la cepa Israel y existe el peligro de que en algún momento la cepa Cerdeña pueda ingresar al país.

Rendimiento

En la figura 5 se muestra el rendimiento total (kg m^{-2}) obtenido por tratamiento, con la partición correspondiente a cada una de las categorías de calidad. El comportamiento

observado en los datos de incidencia y severidad en los tratamientos se ve también reflejado en el rendimiento; el T1 arrojó un rendimiento total significativamente menor en comparación a los testigos, obtuvo un rendimiento 32.8% menor en comparación al testigo susceptible y 34,2% menor que el testigo resistente, mientras que T2 y T3 mantienen un rendimiento estadísticamente similar a los testigos con diferencias entre 5 a 12,4 % e indica que el rendimiento comercial sí se ve afectado por la introgresión de los genes Ty1/Ty3.

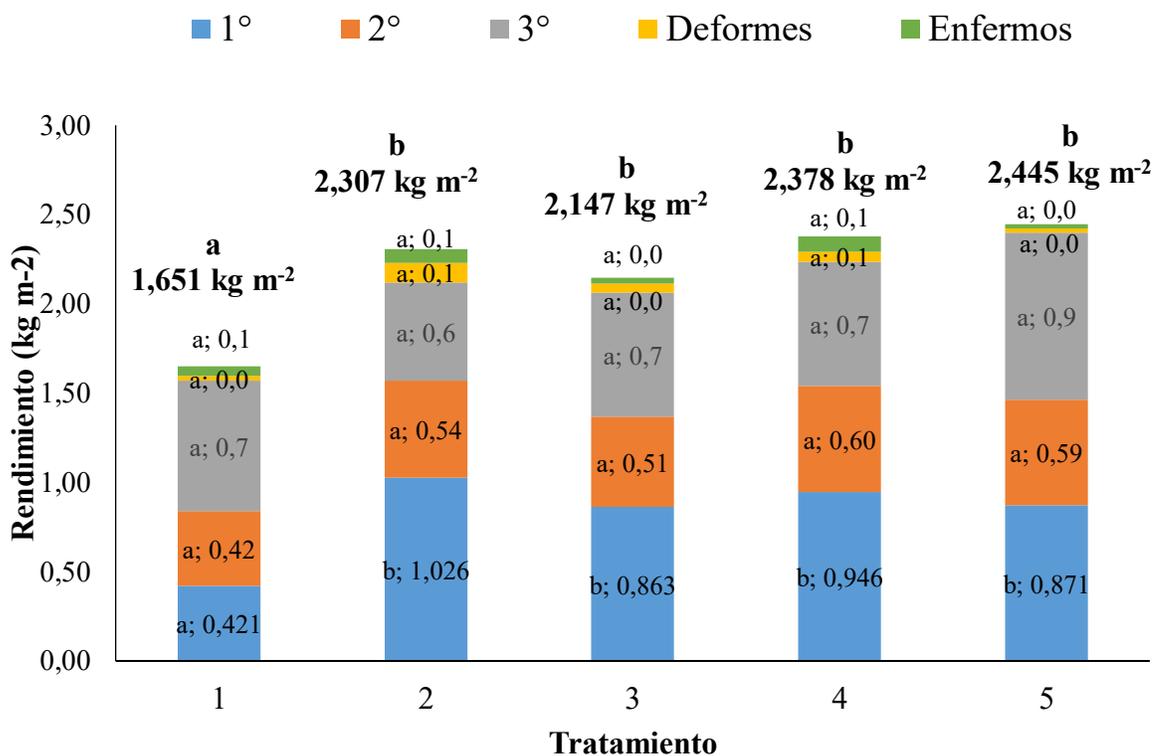


Figura 5. Análisis estadístico del rendimiento total (kg m⁻²) de cada uno de los tratamientos y partición por categoría de clasificación (1º, 2º, 3º, frutos deformes y enfermos). Medias con letras distintas dentro de una misma categoría de fruto son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba Tuckey.

En cuanto a la partición de frutos de 1º y 2º calidad, se encontró que, para frutos de 1º categoría, únicamente el tratamiento 1 posee un menor rendimiento en comparación a los

tratamientos susceptible y resistente. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en el rendimiento de frutos de 2° categoría de calidad en ninguno de los tratamientos.

Por su parte, los tratamientos 2 y 3 no presentaron diferencias significativas con respecto a los testigos susceptible y resistente, por lo tanto, a pesar de la introducción de genes de resistencia, mantienen los genes del parental Prodigio que ofrece un rendimiento total y de frutos de 1° categoría de calidad competitivos con el híbrido comercial DRW-7810 (Figura 6).

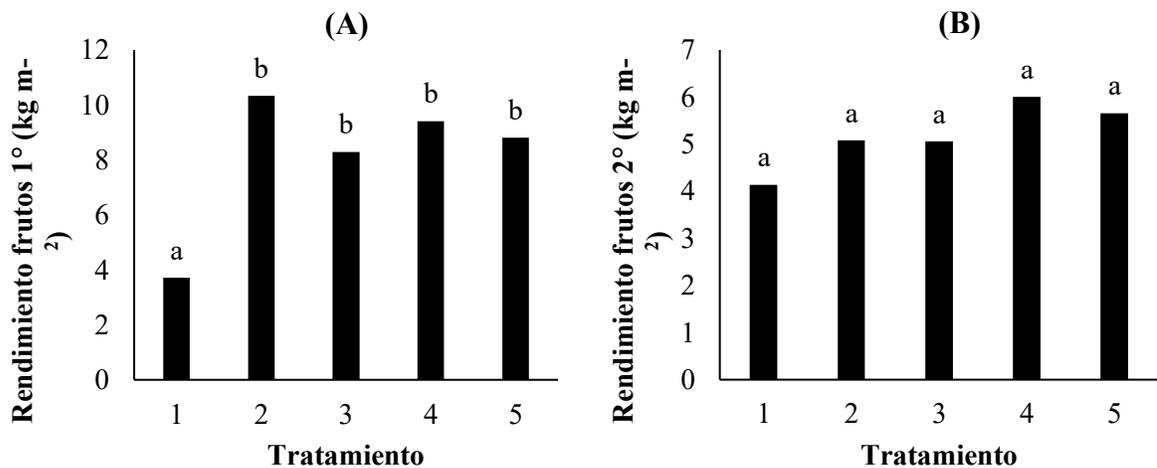


Figura 6. (A) Análisis estadístico del rendimiento de frutos de 1° categoría de calidad (kg m⁻²) con un valor de $p=0,0001$ (altamente significativo) y $CV=12,27$. (B) Rendimiento de frutos de 2° categoría de calidad (kg m⁻²) (derecha) con un valor de $p=0,0603$ (no significativo) y $CV=16,18$. Columnas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba Tuckey.

En un gran número de investigaciones se han obtenido materiales resistentes a TYLCV a partir de genes provenientes de *S. habrochaites* (caso del gen *Ty-2*), muchas líneas han respondido eficazmente a los aislados de Taiwan y del sur de India, también se ha utilizado en programas de mejora para la resistencia a Begomovirus en Guatemala y el Oriente Medio, varios autores han propuesto un control poligénico, el *Ty-2* se considera un “gen mayor” derivado de *S. habrochaites* y está estrechamente relacionado con la resistencia (Pérez, 2007). En esta investigación, el T2 y T3 poseen este gen y según se observa en las

figuras anteriores, no reducen el rendimiento en comparación con los testigos, como sí lo hace el T1 que no contiene el gen *Ty-2*.

A pesar que el gen *Ty-1* es considerado como “altamente resistente” por impedir la transmisión del vector mediante fenómenos de antibiosis o antixenosis, las líneas que lo poseen no han tenido el éxito esperado, debido a la complejidad del control genético que dificulta eliminar las características indeseables del parental donante (Pérez, 2007), en este caso, no se logran reducir las pérdidas de producción en el T1.

Una estrategia que busca ser efectiva, es obtener niveles de resistencia más elevados y duraderos mediante la combinación de resistencia proveniente de distintas fuentes, como el caso del T3, que combina genes provenientes de *S. chilense* y *S. habrochaites* (Pérez, 2007). En el caso del rendimiento, la piramidación de genes resultó efectiva, ya que la combinación de *Ty-1/Ty-3* y *Ty-2* eliminó la diferencia significativa que presentaba el T1 que no contiene el gen *Ty-2* e inclusive, podría probarse en futuros ensayos la durabilidad de dicha resistencia, en comparación con la resistencia que otorga el gen *Ty-2* de manera individual.

Desempeño agronómico

Crecimiento fenológico

En cuanto a la variable “longitud del tallo (cm)”, se dio un crecimiento exponencial a través del tiempo, todos los tratamientos tuvieron un crecimiento más lento en comparación con el testigo resistente, pero fue el T1 el que tuvo un crecimiento más lento. El T2 y testigo susceptible, presentaron un crecimiento muy similar. Por otro lado, el diámetro del tallo no presentó diferencias descriptivas importantes en el tiempo para ninguno de los tratamientos (Figura 7A).

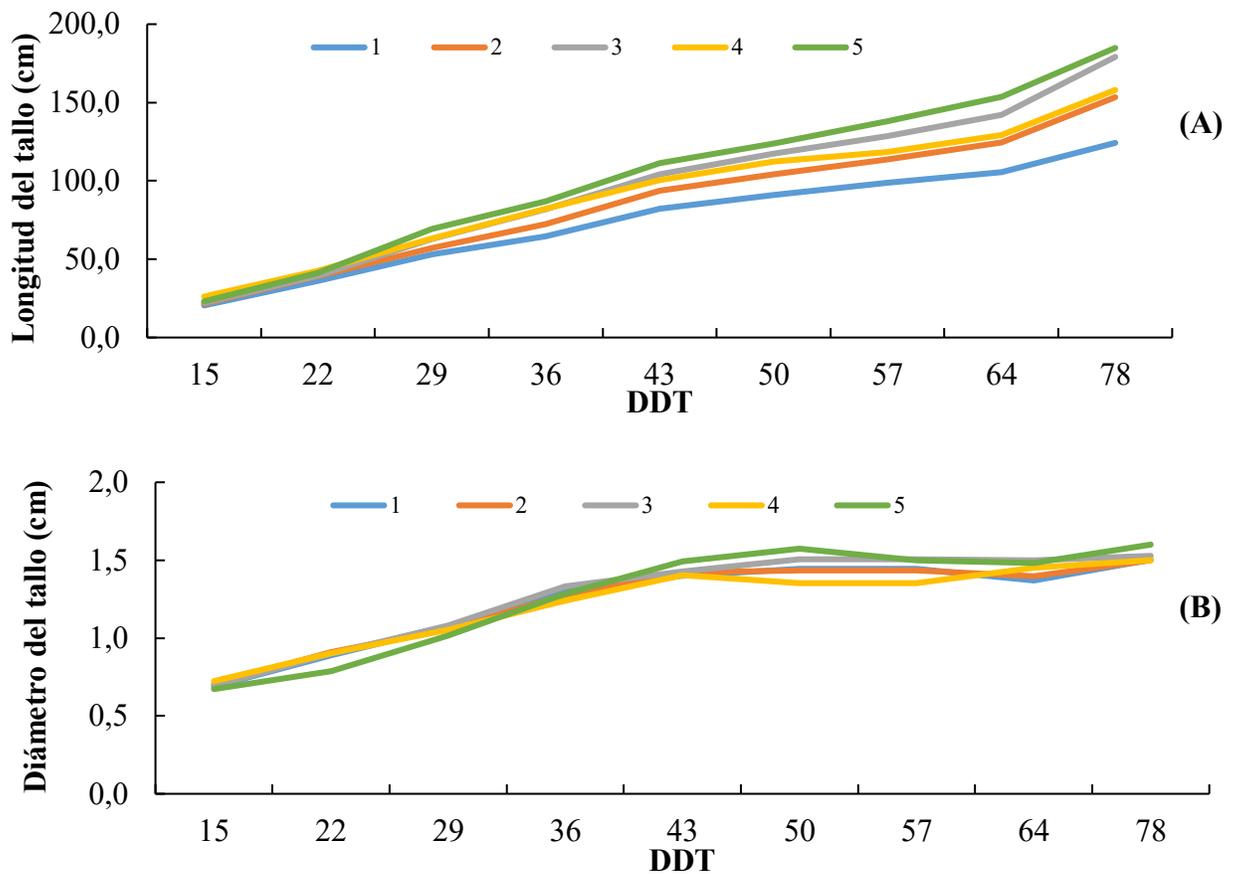


Figura 7. Longitud del tallo (cm) (A) y diámetro del tallo (cm) (B) de las plantas de tomate, evaluadas a través del tiempo desde los 15 hasta los 78 días después del trasplante (DDT).

Los tratamientos 1 y 2 fueron los que presentaron menor altura del primer racimo y menor distancia entre el primer y el segundo racimo en comparación con ambos testigos, lo cual los hace los preferidos por el mercado, ya que entrenudos más cortos, están relacionados con mayor producción de frutos y menor desarrollo vegetativo (Figura 8). Sin embargo, considerando que el tratamiento 1, presenta menor tolerancia al virus y menor rendimiento, es preferible la selección del tratamiento 2.

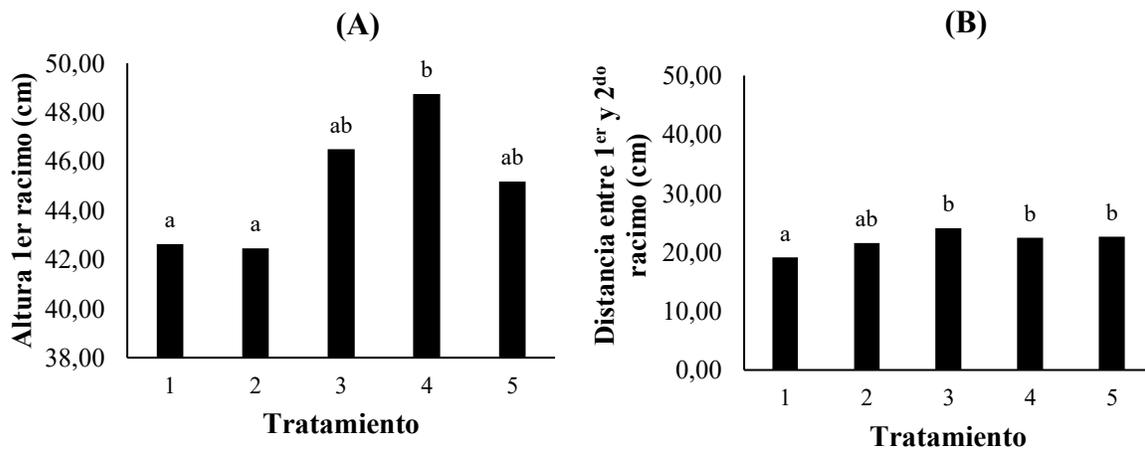


Figura 8. Altura del primer racimo (cm) (A) y distancia entre el primer y segundo racimo (cm) (B) de las plantas de tomate. Ambas variables evaluadas a un valor de significancia de 0,05. Columnas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba Tuckey.

Como se observa en la figura 8, el T2 obtuvo un efecto positivo en comparación con los testigos T4 y T5, ya que presenta menor altura del primer racimo y menor distancia entre el primer y el segundo racimo, lo que significa que la planta posee entrenudos más cortos. Caruso et al., (2015), afirman que las introgresiones de los genes de resistencia provenientes de *S. habrochaites* (de donde proviene el gen *Ty-2*) obtuvieron en muchos casos un efecto positivo en la mejora en su desempeño agronómico con respecto al material genético parental cultivado. El efecto contrario posee la resistencia mediada por el gen *Ty-1*, el cuál puede aportar genes indeseables ligados a la región génica de interés de la especie silvestre (García et al., 2018).

Después de la introgresión de genes, una tarea importante a nivel genético, es eliminar la gran mayoría de los genes indeseables introducidos por el donante silvestre y para esto se requiere una serie de retrocruzamientos con el progenitor recurrente cultivado alternados con endogamia concurrente antes de que se puedan seleccionar las combinaciones deseadas de características parentales. Sin embargo, durante este proceso, algunos de los genes de interés del donante silvestre pueden perderse o eliminarse, lo que limita el nivel de expresión del rasgo en la progenie (Foolad, 2007).

Comportamiento reproductivo

La eficiencia del comportamiento reproductivo se midió mediante el número de frutos en los dos primeros racimos (Figura 9). Todos los tratamientos produjeron una cantidad de frutos similar al testigo 4 en el primer y segundo racimo, y más cantidad de frutos en el primer racimo en comparación al testigo 5.

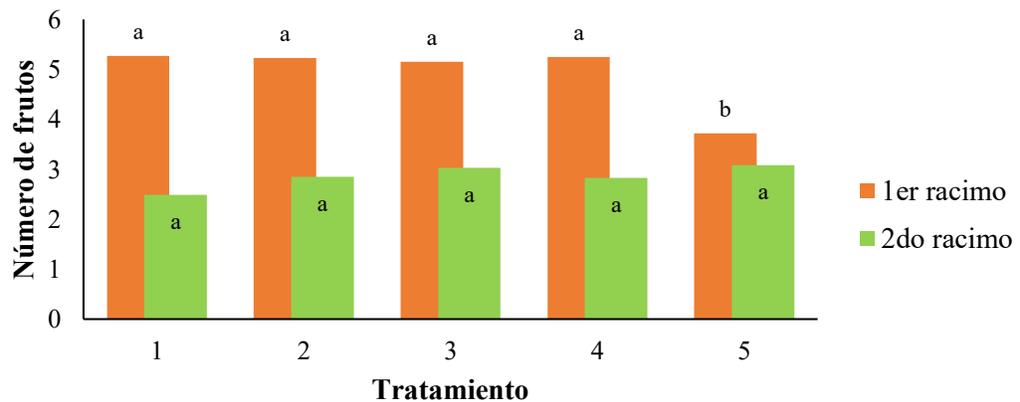


Figura 9. Número de frutos en el primer y segundo racimo. Ambas variables evaluadas a un valor de significancia de 0,05. Columnas del mismo racimo con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba Tuckey.

Varios estudios concuerdan en que existe una relación directa entre el número de racimos por planta y el rendimiento total. Sin embargo, existe la inconformidad de que puede haber una disminución de la masa media de los frutos a medida que el número de racimos aumenta, ya que no hay una distribución uniforme de asimilados hacia toda la planta (Quintana et al., 2010). Por lo tanto, se podrían obtener más cantidad de frutos de 3° calidad,

sin embargo, en esta investigación este parámetro no influyó en la cantidad de frutos de esta categoría.

Calidad de frutos poscosecha

El híbrido Prodigio al aportar una de las líneas para la formación de los nuevos híbridos, fue utilizado como comparador de la calidad de frutos en poscosecha, ya que así se pudo evaluar la posible pérdida de genes que codifican para caracteres de interés agronómico, posterior a la introgresión de genes de resistencia. Los datos obtenidos mostraron que los frutos del tratamiento 2 y 3 son los que mantienen más la calidad frutos en comparación con Prodigio.

En el Cuadro 8 se observa que no hay diferencias significativas en peso y número de lóculos con el híbrido Prodigio para los tratamientos 2 y 3, estos poseen frutos de mayor peso y mayor número de lóculos, comúnmente, lóculos pequeños y densos, que conforman frutos más carnosos. Por lo tanto, los híbridos con el gen *Ty-2* y la combinación piramidal *Ty-1/Ty-3* y *Ty-2*, son los que mantienen de forma más estricta, las características agronómicas deseadas por el mercado que posee el híbrido Prodigio.

Cuadro 8. Promedio de variables poscosecha de calidad de fruto: peso, ancho, alto, número de lóculos, °Brix y firmeza de los frutos de tomate.

Tratamiento	Variable					
	Peso (g)	Ancho (cm)	Alto (cm)	Nº Lóculos	° Brix	Firmeza (N)
1	188,00a	7,25a	6,38a	5,85a	4,14a	35,15a
2	227,06b	7,88a	6,75a	6,61b	3,98a	40,58a
3	221,81b	7,63a	6,75a	6,86b	3,98a	38,74a
4	226,15b	7,50a	6,13a	6,70b	4,13a	36,11a
5	201,79a	8,25a	6,13a	5,10a	4,29a	43,58a

En la figura 10, se observa que tanto para la primera, como para la segunda evaluación poscosecha, el tamaño de la cicatriz apical es muy similar en los tratamientos 2 y 3 con respecto al tratamiento 4, siendo el tratamiento 2 el que muestra una tendencia a presentar

mayor tamaño de cicatriz. Mientras que, el tratamiento 1 es similar al tratamiento 5, con el menor tamaño de cicatriz (Anexo 5).

En este caso, el tratamiento 2 sigue siendo estadísticamente comparable con las características agronómicas de Prodigio, pero un tamaño de cicatriz apical grande no es un carácter favorecedor, por el contrario, el comerciante intermediario prefiere frutos con un tamaño de cicatriz pequeño. Lo anterior podría ser un punto de mejora para el híbrido que cumplió con todos los demás parámetros deseados, si así el mercado lo requiriera.

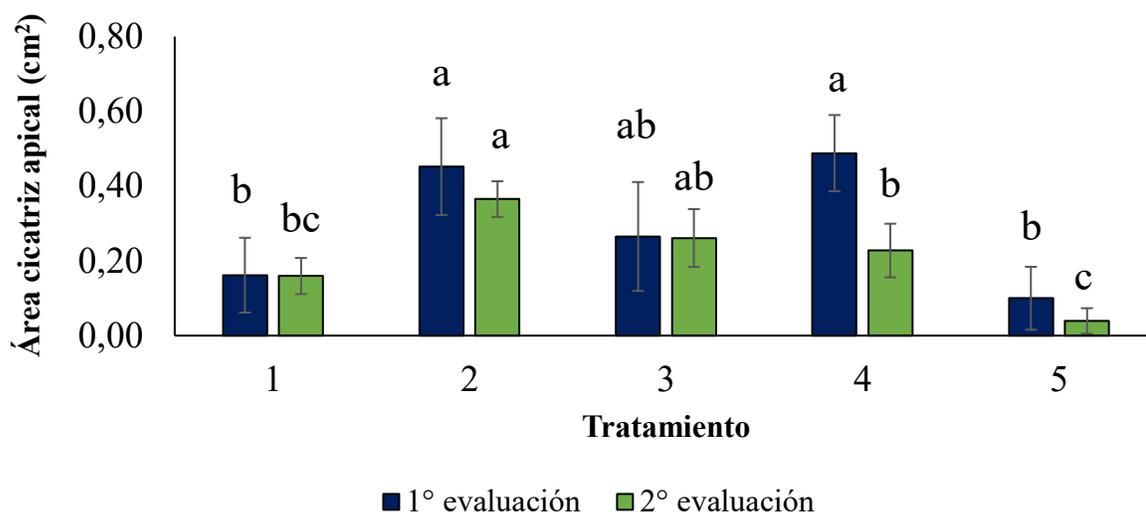


Figura 10. Análisis estadístico del tamaño de cicatriz apical (cm²) de cada uno de los tratamientos en la primera y la segunda evaluación poscosecha obtenido mediante el programa ImageJ. Columnas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba Tuckey. Evaluaciones realizadas a los 78 y 156 DDT, respectivamente.

Los programas de mejora genética han permitido responder rápidamente ante las necesidades y nuevos retos en la agricultura, sin embargo, cuando se debe recurrir al empleo de especies silvestres como fuentes de variación el proceso puede tardar varias generaciones hasta poder eliminar caracteres desfavorables en la producción que muchas veces son dominantes (García et al, 2018 & Ji et al., 2007). En esta investigación, la introgresión de genes no afectó las variables por cosecha para la calidad del fruto en ninguno de los

tratamientos (Cuadro 8). Sin embargo, para el T2, se obtuvo la característica desfavorable de poseer una cicatriz apical más grande de lo deseada por el mercado.

Conclusiones

Se acepta la hipótesis nula de esta investigación, la cual propone que entre más cantidad de genes de resistencia posea una variedad (piramidación de genes) mayor tolerancia al virus se obtiene. Esto por cuanto se observa una resistencia elevada cuando se involucra el gen *Ty-2*.

El comportamiento observado en los datos de incidencia y severidad en los tratamientos se ve también reflejado en el rendimiento, ya que el T1 arrojó un rendimiento total significativamente menor en comparación a los testigos, mientras que la piramidación de genes en el T3 logró mejorar el rendimiento del cultivo y otros caracteres de importancia agronómica, hasta no existir diferencias significativas con los testigos.

Se concluye que los tratamientos T2 y T3, son los que cumplen de mejor manera con los objetivos de esta investigación, ya que poseen la menor incidencia e índice de severidad ante el virus TYLCV, en comparación con el testigo comercial resistente. Además, poseen un rendimiento y desempeño agronómico (crecimiento fenológico y reproductivo) comparables al híbrido Prodigio.

Recomendaciones

- Según los resultados obtenidos en esta tesis, el T2 y T3 poseen buenos rendimientos y tolerancia al TYLCV, por lo cual recomiendo dar seguimiento a ensayos para probar si la piramidación de genes puede generar una resistencia más prolongada y de amplio espectro.
- Poner a prueba los tratamientos seleccionados, ante otras enfermedades y/o plagas importantes en el país, como *R. solanacearum*, para verificar que, al momento de la introgresión de genes de resistencia, no se haya afectado la presencia de genes relacionados con la tolerancia a la marchitez bacteriana que posee el híbrido Prodigio.
- Poner los híbridos seleccionados a prueba con otras cepas del TYLCV, con el fin de elegir cultivares con un amplio espectro de resistencia ante otras cepas que supongan un peligro potencial si llegaran a ingresar al país.
- Continuar con evaluaciones fenotípicas y moleculares con el fin de reunir las características deseadas en los híbridos con el gen de resistencia *Ty-2* y eliminar caracteres negativos, como el tamaño de la cicatriz apical.
- Evaluar el rendimiento y características agronómicas de estos nuevos híbridos en otros ambientes y localidades para establecer la mejor versión según la localización geográfica.

Bibliografía

- Alonso, A., García, S., Vázquez, L., Ruiz, J., & Carbonell, A. (2010). Comparative post-harvest behavior of traditional and virus-resistant *Muchamiel* tomatoes. *Wiley InterScience*, 90(6),1056-1062. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3920>
- Arroyo, D. (26 de abril de 2017). *Cómo ha afectado el virus de la cuchara las plantaciones de tomate a partir de su aparición y soluciones* [Memoria]. PITTA: IV Congreso Nacional del Cultivo del Tomate. San José, Costa Rica. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/A50-10881.pdf>
- Ávila, R; Cabello, A; Ortiz, F; Lirola, J; Martín, A. (1996). Agua, riego y fertirrigación. Dirección General de Investigación y Formación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla.
- Bai, Y; Verlaan, M. y Hutton, S. (2019). Tomato yellow leaf curl virus resistance. (United States Patent No.US10,378,025 B2). University of Florida Research Foundation Inc. <https://patentimages.storage.googleapis.com/17/7a/83/1fa4689428e6cb/US20140208459A1.pdf>
- Barbieri, M; Acciarri, N; Sabatini, E; Sardo, L; Acotto, G. y Pecchioni, N. (2010). Introgression of resistance to two mediterranean virus species causing Tomato yellow leaf curl into a valuable traditional tomato variety. *Journal of Plant Pathology*, 92 (2): 485-493. <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/193/60>
- Barboza, N; Blanco-Meneses, M; Hallwas, M; Moriones, E; Nagata, A. 2014. First Report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Tomato in Costa Rica. *Plant disease*. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0881-PDN>
- Baquero, R. A. Q; López, H. E. B; Herrera, J. G. Á; Hernández, J. F. C; & Pinzón, H. H. (2010). Efecto del número de racimos por planta sobre el rendimiento de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 4(2), 185-198. Efecto del número de racimos por planta sobre el rendimiento de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) | Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas (uptc.edu.co)

- Bernal, R. (2010). *Enfermedades de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en invernadero en las zonas de Salto y Bella Unión*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429230710110412.pdf>
- Boiteux, L. S; Pereira-Carvalho, R. C; Inoue-Nagata, A. K; Fonseca, M. E. D. N., RESENDE, R. D. O., & Fernández-Muñoz, R. (2007). Reação de acessos de tomateiro portando o gene *Ty-2* (introgrado de *Solanum habrochaites* f. *glabratum*) a um isolado de begomovírus de genoma bipartido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 47.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CUCURBITÁCEAS, 4., 2007, Porto Seguro. Resgatando e valorizando as hortaliças subutilizadas. Porto Seguro: Associação Brasileira de Horticultura, 2007.
- Butterbach, P; Verlaan, M. G; Dulleman, A; Lohuis, D; Visser, R. G; Bai, Y; & Kormelink, R. (2014). Tomato yellow leaf curl virus resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), 12942–12947. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400894111>
- Campos, S; López, L; Barrantes, J; Mora, J; Saborío, D. y Echandi, C. (26 de abril de 2017). *Respuesta de varios híbridos comerciales y cultivares promisorios de tomate (Solanum lycopersicum) ante la presencia del virus TYLCV bajo condiciones de campo* [Memoria]. PITTA: IV Congreso Nacional del Cultivo del Tomate. San José, Costa Rica. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/A50-10881.pdf>
- Caruso, G; Broglia, V; Pocovi, M. (2015). Uso de germoplasma silvestre en el programa de mejora de tomate. *Biodiversidad y Conservación*, 4: 1. <http://portalderevistas.unsa.edu.ar/ojs/index.php/Lhawet/article/view/271/257>
- Decreto N° 31890 de 2004 [MEIC-MAG]. Reglamento Técnico RTCR 379: 2004 tomate para consumo en estado fresco. 20 de julio de 2004.
- Dellaporta, S; Wood, J y Hicks, J. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4): 19-21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>

- Dueñas, F; Álvarez, M; Moya, C; Martínez, Y; Peteira, B; Arias, Y., ... & Shagrodski, T. (2008). Caracterización agromorfológica y evaluación de la resistencia al TYLCV en nuevos genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como apoyo al programa de mejoramiento genético de la hortaliza para la enfermedad. *Cultivos Tropicales*, 29(1), 53-60.
- Dueñas, F; Álvarez, M; Moya, C; & Martínez, Y. (2011). Identificación del gen *Ty-3*, de resistencia a begomovirus, en accesiones de *Solanum lycopersicum* L. *Cultivos Tropicales*, 32(2), 136-142.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362011000200004
- Dueñas, F. (2012). *Identificación y aprovechamiento de fuentes de resistencia en tomate (Solanum lycopersicum L.), frente a Begomovirus que afectan al cultivo* [Tesis de doctorado, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas].
[http://repositorio.geotech.cu/xmlui/bitstream/handle/1234/3604/Identificaci%
c3%
b3n%20de%20fuentes%20de%20resistencia%20en%20tomate%20a%20begomovi
rus.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.geotech.cu/xmlui/bitstream/handle/1234/3604/Identificaci%c3%b3n%20de%20fuentes%20de%20resistencia%20en%20tomate%20a%20begomovirus.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Dueñas, F; Álvarez, M; Moya, C; Martínez, Y; Pereira, B. y Arias, Y. (2009). Identificación de los genes *Ty-2* y *Ty-3* de resistencia a *Begomovirus* y su grado de homocigosis en nuevas accesiones de tomate. *Cultivos Tropicales*, 30(1): 61-64.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362009000100010
- Foolad, M. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. International Journal of Plant Genomics. 52p.
<https://downloads.hindawi.com/archive/2007/064358.pdf>
- García, J; Pérez, O; Cos, J; Ruiz, L; Sánchez, E. 2018. Ciencias Hortícolas, S. E., & de Genética, S. E. INFLUENCIA DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN LA MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS. 408p. [https://sftt.ndtg.es/wp-content/uploads/2022/03/40.-Influencia-del-cambio-clima%
CC%81tico-en-la-mejora-gene%
CC%81tica-de-plantas.pdf](https://sftt.ndtg.es/wp-content/uploads/2022/03/40.-Influencia-del-cambio-clima%CC%81tico-en-la-mejora-gene%CC%81tica-de-plantas.pdf)
- Goyenaga, R. (2016). *Nueva semilla de tomate. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección Regional Central Occidental* [Archivo PDF].
<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/drocc-hoja-divulgativa-34-2016.pdf>

- Hilje, L. y Stansly, P. (2017). Dificultades metodológicas en la selección de cultivos trampa para el manejo del complejo Bemisia *tabaci*-virus en tomate. *Revista de Ciencias Ambientales*, 51(1), 76-91. <https://doi.org/10.15359/rca.51-1.6>
- Huang, L., Ren, Q., Sun, Y., Ye, L., Cao, H. y Ge, F. (2012). Lower incidence and severity of tomato virus in elevated CO² is accompanied by modulated plant induced defense in tomato. *Plant Biology*, 14(6): 905-913. [10.1111/j.1438-8677.2012.00582.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00582.x)
- Huertas, C. (2019). *Validación de la canaleta de demanda inteligente como control de riego utilizando sondas capacitivas, en tomate (Solanum lycopersicum) var. Gladiador, en sistema hidropónico bajo invernadero* [Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/6328/1/43773.pdf>
- Ji, Y; Schuster, D & Scott, J. (2007). *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*, 20(3), 271-284. [Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato | SpringerLink](https://doi.org/10.1007/s12227-007-9038-1)
- Joshi, R.K. y Nayak, S. (2010). Gene pyramiding- A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Biotechnology and Molecular biology Review*, 5(3):51-60. https://academicjournals.org/article/article1380108543_Joshi%20and%20Nayak.pdf
- Kil, E., Kim, S., Lee, Y., Byun, H., Park, J., Seo, H., Kim, C., Shim, J., Lee, J., Kim, J., Lee, K., Choi, H., Lee, S. (2016). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports*, 6(19013):1-10. <https://www.nature.com/articles/srep19013>
- Kothe, S. y Pereira, R. (1997). Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. *Ciencia Rural*, 27(4):685-689. <https://www.scielo.br/pdf/cr/v27n4/a28v27n4.pdf>
- Lahoz, I; Santos, A; Malumbres, A; Bozal, J; Mauleón, J. y Calvillo, S. (2020). Tomate de industria. Campaña 2019. Navarra Agraria.

<https://www.navarraagraria.com/categories/item/1656-tomate-de-industria-campana-2019>

- Lapidot, M. y Friedmann, M. (2002). Breeding for resistance to whitefly transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology*, 140: 109–127. https://www.agri.gov.il/download/files/Lapidot%20&%20Friedmann%202002_1.pdf
- Liu, B; Preisser, E. L; Yang, Z; Jiao, X; & Zhang, Y. (2021). Sulfoxaflor alters *Bemisia tabaci* MED (Hemiptera: Aleyrodidae) preference, feeding, and TYLCV Transmission. *Journal of Economic Entomology*, 114(4), 1568-1574.
- López, L. (2016). *Manual técnico del cultivo de tomate Solanum lycopersicum*. INTA-Programa Regional de Investigación e Innovación por Cadenas de Valor Agrícola (UE/IICA). <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>
- López, L. (2018). Evaluación de híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en condiciones de campo en Salitral de Santa Ana. *Alcances tecnológicos*, 12(1):59-72. http://revista.inta.go.cr/index.php/alcances_tecnologicos/article/view/171/148
- Matamoros, D. (26 de abril de 2017). *Distribución del virus de la cuchara en las plantaciones de tomate en Costa Rica* [Memoria]. PITTA: IV Congreso Nacional del Cultivo del Tomate. San José, Costa Rica. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/A50-10881.pdf>
- Pérez, A. (2007). *Mejora genética para la resistencia a los geminivirus tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) y tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) en tomate*. [Tesis de doctorado, Universidad Politécnica de Valencia]. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/135825/Tesis.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Pacheco, J. (2017). *Búsqueda de fuentes de resistencia a patógenos en Solanum lycopersicum var. cerasiforme y en Solanum pimpinellifolium*. [Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia]. <https://riunet.upv.es/handle/10251/90138>
- Park, J; Kil, E; Kil, J; Shin, Y; Heo, N y Lee, S. (2014). Rapid detection and identification of six tomato yellow leaf curl virus isolates from different regions using polymerase

- chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Phytopathology*, 162(2014): 209-217. <https://sci-hub.st/10.1111/jph.12172>.
- Polston, E; Capobianco, H. (2013). Transmitting plant viruses using whiteflies. *Journal of Visualized Experiments*, 81(e4332):1-10. <https://www.jove.com/pdf/4332/jove-protocol-4332-transmitting-plant-viruses-using-whiteflies>
- Ramos, N. (2015). *Informe de servicios profesionales. Producción de semilla de tomate (Solanum lycopersicum L.) Y San Ola (Citrullus lannatus Thumb.)* En la empresa Novoliz S.A-ICA. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/411/M-21617.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez, A; Florido, M; Dueñas, F; Muñoz, L; Hanson, P. y Álvarez, M. (2017). Caracterización morfoagronómica en líneas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) con resistencia a *Begomovirus*. *Cultivos Tropicales*, 38 (2): 70-79. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362017000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Rubio, O; Cadena, M. y Flores, R. (2016). Comparación de la resistencia horizontal y vertical contra el tizón tardío de la papa en Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(4): 755-766. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-09342016000400755&lng=es&nrm=iso
- Sade, D; Sade, N; Brotman, Y. y Czosnek, H. (2020). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-resistant tomatoes share molecular mechanisms sustaining resistance with their wild progenitor *Solanum habrochaites* but not with TYLCV-susceptible tomatoes. *Plant Science*, 1-6. [10.1016/j.plantsci.2020.110439](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110439)
- Soto, F. (2015). Hidroponía familiar en sustrato: hágalo fácil. *Sembrando hortalizas, cosechando salud: Manual práctico*. MAG/UCR. 60p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10809.pdf>
- Verlaan, M; Hutton, S; Ibrahim, R; Kormelink, R; Visser, R; Scott, J; Edwards, J. y Bai, Y. (2013). The Tomato yellow leaf curl virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-Class RNA- dependent RNA polymerases. *PLOS Genetics*, 9(3): 1-11.

[https://journals.plos.org/plosgenetics/article/file?id=10.1371/journal.pgen.1003399
&type=printable](https://journals.plos.org/plosgenetics/article/file?id=10.1371/journal.pgen.1003399&type=printable)

Vidavski, F; Czosnek, H; Gazit, S; Levy, D. y Lapidot, M. (2008). Pyramiding of genes conferring resistance to Tomato yellow leaf curl virus from different wild tomato species. *Plant Breeding*, 127: 625-631.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01198/full>

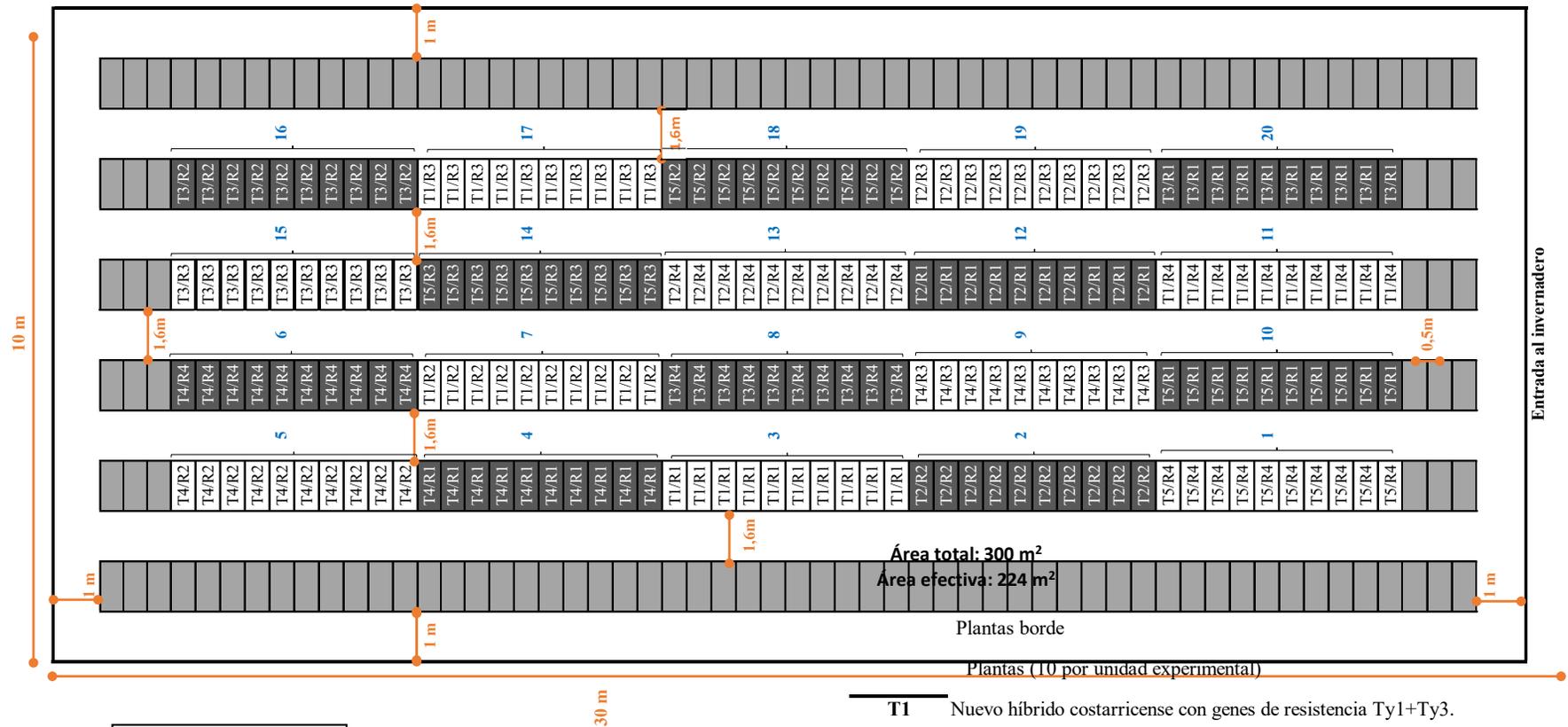
Yan, Z; Pérez-de-Castro, A; Díez, M. J; Hutton, S. F; Visser, R. G; Wolters, A. M. A; ... & Li, J. (2018). Resistance to Tomato yellow leaf curl virus in tomato germplasm. *Frontiers in plant science*, 9, 1198. [Frontiers | Resistance to Tomato yellow leaf curl virus in tomato germplasm \(frontiersin.org\)](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01198/full)

Yan, Z; Wolters, A-M; Navas, J; Bai, Y. (2021). The global dimension of *Tomato Yellow Leaf Curl* Disease: current status and breeding perspectives. *Microorganisms*, 9: 740.

<https://www.researchgate.net/publication/350585490> The Global Dimension of Tomato yellow leaf curl Disease Current Status and Breeding Perspectives

Anexos

Anexo 1. Diagrama de la disposición del diseño experimental en el invernadero de Hortalizas, de la EEA FBM



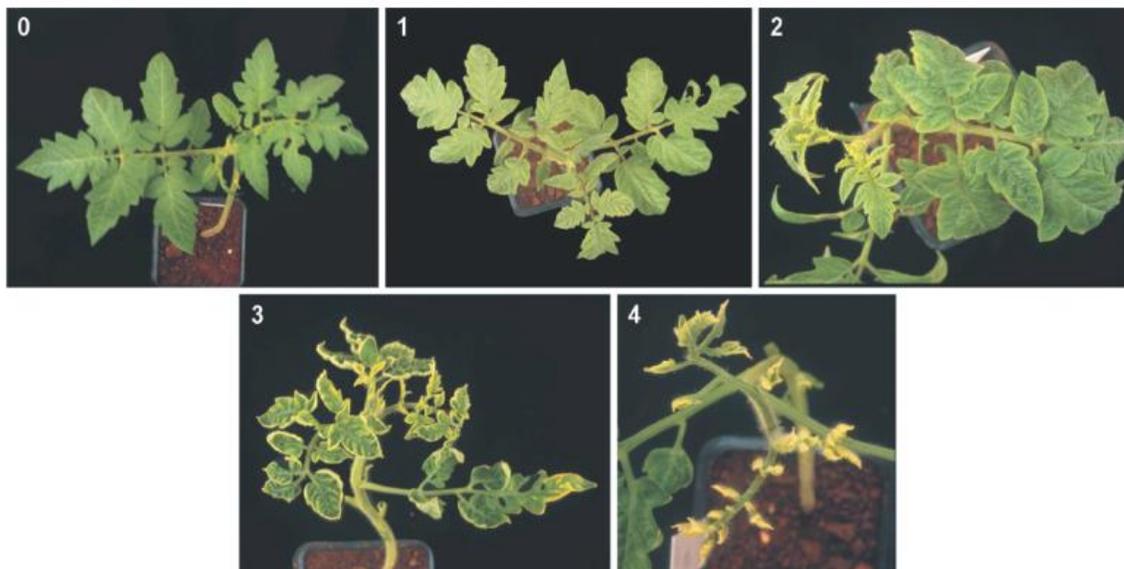
Área total: 300 m²
Área efectiva: 224 m²

Plantas borde
Plantas (10 por unidad experimental)

- T1** Nuevo híbrido costarricense con genes de resistencia Ty1+Ty3.
- T2** Nuevo híbrido costarricense con genes de resistencia Ty2
- T3** Nuevo híbrido costarricense con genes de resistencia Ty1+Ty2+Ty3.
- T4** Prodigio 1 (Testigo susceptible).
- T5** Híbrido comercial de semilla importada "DRW-7810" (testigo resistente)
- R** Número de repetición
- 1-20** Número de parcela

- T1** Nuevo híbrido costarricense con genes de resistencia Ty1+Ty3.
- T2** Nuevo híbrido costarricense con genes de resistencia Ty2
- T3** Nuevo híbrido costarricense con genes de resistencia Ty1+Ty2+Ty3.
- T4** Prodigio 1 (Testigo susceptible).
- T5** Híbrido comercial de semilla importada "DRW-7810" (testigo resistente)
- R** Número de repetición
- 1-20** Número de parcela
- m** Distanciamiento entre plantas y medidas del invernadero

Anexo 2. Escala visual para la cuantificación de la severidad del virus de la cuchara (Tomato yellow leaf curl virus) (Lapidot y Fridmann, 2002).



Anexo 3. Concordancia entre los resultados de la primera hibridación “Dot blot” con sondas y los resultados del PCR realizados a muestras de tejido foliar de tomate a los 30 DDT. Las muestras analizadas, se eligieron por presentar síntomas en campo.

Muestra correspondiente	Resultado de hibridación	Resultados PCR	Concordancia
T5R1P4	Positivo	Positivo	Sí
T5R1P8	Positivo	Positivo	Sí
T5R2P2	Positivo	Positivo	Sí
T5R4P1	Positivo	Positivo	Sí
T5R3P7	Positivo	Positivo	Sí
T5R3P3	Positivo	Positivo	Sí
T5R2P5	Positivo	Positivo	Sí
T5R4P6	Positivo	Positivo	Sí
T1R4P1	Positivo	Positivo	Sí
T1R2P8	Positivo	Positivo	Sí
T1R2P9	Positivo	Positivo	Sí
T1R3P4	Positivo	Positivo	Sí
T1R1P8	Positivo	Positivo	Sí
T1R3P3	Positivo	Positivo	Sí
T1R2P6	Positivo	Positivo	Sí
T1R4P9	Positivo	Positivo	Sí
T1R3P8	Positivo	Positivo	Sí
T1R3P9	Positivo	Positivo	Sí
T1R1P4	Positivo	Positivo	Sí
T1R4P2	Positivo	Positivo	Sí
T1R1P10	Positivo	Positivo	Sí
T1R1P3	Positivo	Positivo	Sí
T1R2P4	Positivo	Positivo	Sí
T1R4P3	Positivo	Positivo	Sí
T2R1P8	Negativo	Poco ADN	No
T2R3P4	Negativo	Poco ADN	No
T3R1P1	Negativo	Poco ADN	No
T3R3P6	Negativo	Poco ADN	No
T4R2P5	Negativo	Poco ADN	No
T4R4P6	Negativo	Poco ADN	No

Anexo 4. Concordancia entre los resultados de la segunda hibridación “Dot blot” con sondas y los resultados del PCR realizados a muestras de tejido foliar de tomate a los 161 DDT. Las muestras analizadas, se eligieron por presentar síntomas en campo.

Muestra correspondiente	Resultado de hibridación	Resultados PCR	Concordancia
T3R1P4	Negativo	Negativo	Sí
T2R3P1	Positivo	Positivo	Sí
T5R2P1	Positivo	Positivo	Sí
T5R2P4	Negativo	Negativo	Sí
T5R2P5	Positivo	Positivo	Sí
T5R2P9	Positivo	Positivo	Sí
T1R3P4	Positivo	Positivo	Sí
T1R3P8	Positivo	Poco ADN	Sí
T3R2P3	Poco ADN	Negativo	No
T1R4P1	Positivo	Poco ADN	Sí
T1R4P4	Poco ADN	Poco ADN	Sí
T2R1P1	Negativo	Negativo	Sí
T2R1P7	Poco ADN	Negativo	No
T5R3P3	Positivo	Poco ADN	Sí
T5R3P8	Positivo	Positivo	Sí
T3R3P3	Poco ADN	Poco ADN	Sí
T5R1P4	Positivo	Positivo	Sí
T5R1P7	Negativo	Negativo	Sí
T1R2P2	Positivo	Positivo	Sí
T1R2P6	Positivo	Negativo	No
T4R4P2	Negativo	Negativo	Sí
T5R4P7	Positivo	Poco ADN	Sí
T5R4P10	Positivo	Poco ADN	Sí
T1R1P3	Positivo	Positivo	Sí
T1R1P10	Poco ADN	Positivo	Sí
T4R2P4	Negativo	Negativo	Sí
T4R1P3	Positivo	Positivo	Sí
T4R3P4	Positivo	Positivo	Sí

Anexo 5. Fotografías de los frutos representativos por tratamiento para medir el área de cicatriz apical con el uso del Software ImageJ durante la primera evaluación.

A) Tratamiento 1. **B)** Tratamiento 2. **C)** Tratamiento 3. **D)** Tratamiento 4. **E)** Tratamiento 5.



Anexo 6. Resultados de la primera hibridación con sondas realizado en el Centro de

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
Teléfono: (506) 2511 2318, 2511 2312. Fax (506) 2511 3190
San José, Costa Rica
gerardoalcides.sanchez@ucr.ac.cr
eduardo.hernandez@ucr.ac.cr



CIBCM Centro de Investigación en
Biología Celular y Molecular

16 de noviembre de 2020
CIBCM/UCR-Diag200-20

Atención
Dr. Walter Barrantes

Asunto: Informe de la detección molecular de TYLCV

Estimado señor:

Le informo que el análisis que se nos solicitó, de 90 muestras de tejido foliar de tomate, fue realizado satisfactoriamente. A las mismas se les realizó extracción de ácidos nucleicos totales y posteriormente se analizó por la técnica conocida como hibridación molecular "Dot blot", utilizando una sonda específica que hibrida un segmento del genoma que se localiza en la Región Intergénica del virus. Los resultados se detallan a continuación:

T3-R1-P6	T3-R1-P9	T3-R1-P10	T2-R3-P1*	T2-R3-P4	T2-R3-P8	T5-R2-P1*	T5-R2-P3	T5-R2-P4	T5-R2-P5	T5-R2-P7	T5-R2-P8*
T5-R2-P9*	T1-R3-P1	T1-R3-P2	T1-R3-P4*	T1-R3-P7	T1-R3-P8*	T1-R3-P9*	T1-R3-P10	T3-R2-P1	T3-R2-P3	T3-R2-P5	T3-R2-P7
T1-R4-P1*	T1-R4-P2*	T1-R4-P3	T1-R4-P4	T1-R4-P5*	T1-R4-P6*	T1-R4-P7	T2-R1-P1	T2-R1-P3	T2-R1-P5	T2-R1-P7	T2-R4-P1
T2-R4-P3	T2-R4-P5	T2-R4-P7	T5-R3-P1	T5-R3-P3	T5-R3-P4	T5-R3-P5	T5-R3-P7	T5-R3-P8	T5-R3-P10	T3-R3-P1	T3-R3-P3
T3-R3-P5	T3-R3-P7	T5-R1-P1	T5-R1-P2	T5-R1-P3	T5-R1-P4	T5-R1-P7	T5-R1-P8	T5-R1-P9	T4-R3-P1	T4-R3-P7	T3-R4-P1
T3-R4-P4	T3-R4-P10	T1-R2-P1	T1-R2-P2*	T1-R2-P3*	T1-R2-P4*	T1-R2-P5*	T1-R2-P6*	T1-R2-P10	T4-R4-P1	T4-R4-P2	T4-R4-P4
T4-R4-P6	T5-R4-P1	T5-R4-P3	T5-R4-P5	T5-R4-P7	T5-R4-P8	T5-R4-P10	T2-R2-P1	T2-R2-P3	T2-R2-P6	T2-R2-P8	T1-R1-P1
T1-R1-P3*	T1-R1-P4*	T1-R1-P5	T1-R1-P8*	T1-R1-P10	T4-R2-P4						

Los códigos sombreados corresponden a las muestras positivas para este análisis.

*Ápices claramente sintomáticos al momento de toma de la muestra en el laboratorio.

Quedamos a sus órdenes en caso que desee realizar una consulta o aclarar alguna duda.

Atentamente,

Lic. Eduardo Hernández Jiménez
Laboratorio de Biología Molecular de Virus y Plantas, CIBCM-UCR



c.c. Archivo
Dr. Alcides Sánchez Monge

Anexo 7. Resultados de la segunda hibridación con sondas realizado en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
Teléfono: (506) 2511 2318, 2511 2312. Fax (506) 2511 3190
San José, Costa Rica
gerardoalcides.sanchez@ucr.ac.cr
eduardo.hernandez@ucr.ac.cr

CIBCM Centro de Investigación en
Biología Celular y Molecular

25 de marzo de 2021
CIBCM/UCR-Diag202-21

Atención
Dr. Walter Barrantes

Asunto: Informe de la detección molecular de TYLCV

Estimado señor:

Le informo que el análisis que se nos solicitó, de 95 muestras de tejido foliar de tomate, fue realizado satisfactoriamente. A las mismas se les realizó extracción de ácidos nucleicos totales y posteriormente se analizó por la técnica conocida como hibridación molecular "Dot blot", utilizando una sonda específica que hibrida un segmento del genoma que se localiza en la Región Intergénica del virus. Los resultados se detallan a continuación:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22*	23*	24*
25	26	27	28*	29	30	31	32	33	34*	35*	36*
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47*	48*
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
85	86	87	88	89*	90	91	92	93	94	95	

Los códigos sombreados corresponden a las muestras positivas a la presencia del virus TYLCV.

*Muestras 22, 23, 24, 28, 34, 35, 36, 47, 48 y 89 se reportan positivas a la presencia del virus, aunque la cantidad de ADN detectado se encuentra muy cerca del límite de detección del ensayo.

Quedamos a sus órdenes en caso que desee realizar una consulta o aclarar alguna duda.

Atentamente,

Lic. Eduardo Hernández Jiménez
Laboratorio de Biología Molecular de Virus y Plantas, CIBCM-UCR



Anexo 8. (a) Temperatura (°C) promedio, máxima y mínima durante todo el ciclo del cultivo. **(b)** Humedad relativa promedio, máxima y mínima durante todo el ciclo del cultivo. Datos obtenidos de un Data Logger marca HOBOWare®, ubicado dentro del invernadero.

