

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad
Valenciana



BÚSQUEDA DE FUENTES DE RESISTENCIA AL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE NUEVA DELHI (*Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV*) EN TOMATE

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Presentado por:

Bolívar Alfredo Mantilla Paredes

Dirigido por:

Dr. D. Salvador Soler Aleixandre

Directora Experimental:

D^a. María Rosario Figàs Moreno

VALENCIA, junio 2018

RESUMEN

El virus del rizado amarillo del tomate Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV), transmitido naturalmente por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, causa daños económicos importantes en varios cultivos de cucurbitáceas (pepino, melón, sandía y calabacín) y solanáceas (berenjena, patata y tomate) en muchos países del mundo. En España, desde 2013, está causando daños severos en los cultivos de melón y calabacín. Este año, también se informó sobre la infección de un cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo invernadero con ToLCNDV en Almería (España). Los síntomas consistían en manchas cloróticas y distorsión de las venas en las hojas medias e inferiores. La disponibilidad de protocolos de inoculación y métodos de detección simples y eficientes es necesaria para el cribado de colecciones de germoplasma de tomate. Hemos evaluado la posibilidad de la inoculación mecánica de ToLCNDV en tomate como método de selección. Como se había citado anteriormente, este virus no se puede transmitir en tomate mediante inoculación mecánica. Posteriormente se usó un método de inoculación con *B. tabaci*. Para ello, utilizando una variedad valenciana tradicional de tomate tipo 'De Penjar', se han probado diferentes tiempos de permanencia de las plantas en jaulas con una población de mosca blanca virulífera (5, 10, 15 y 20 días). Se obtuvo un porcentaje del 100% de plantas infectadas con los 3 últimos tiempos de inoculación utilizados. Luego se procedió a probar una colección de 8 variedades tradicionales pertenecientes a diferentes tipos valencianos tradicionales de tomate por inoculación con mosca blanca durante los mismos períodos de inoculación. En 6 de las 8 variedades, se obtuvo un 100% de plantas con infección sistémica con todos los períodos de inoculación, y en dos variedades, se obtuvo un 75% de plantas infectadas después de 5 días y el 100% con los tratamientos restantes. Estos resultados indican que es necesaria una permanencia de al menos 10 días para obtener una eficacia del 100% en la infección por ToLCNDV de plantas susceptibles. A partir de este momento, el tiempo de inoculación (permanencia de las plantas en las jaulas con moscas virulíferas) se fijó en 10 días. En estas condiciones, se llevó a cabo un cribado en el que se utilizó una colección de 18 entradas de especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado. Esto incluyó 2 entradas de *S. arcanum*, 2 de *S. chilense*, 2 de *S. chmielewskii*, 1 de *S. corneliomulleri*, 2 de *S. galapagense*, 2 de *S. habrochaites*, 2 de *S. huaylasense*, 1 de *S. neorickii*, 1 de *S. pennellii*, 2 de *S. peruvianum* y 1 de *S. pimpinellifolium*. En este experimento, utilizamos la detección serológica mediante un análisis de TAS-ELISA usando un antisuero específico para el virus del manchado clorótico de la sandía (*Watermelon chlorotic stunt virus*, WmCSV). Las 8 variedades tradicionales mostraron el 100% de las plantas con síntomas típicos de ToLCNDV. Usando el antisuero WmCSV en las plantas sintomáticas, la detección del virus aumentó sustancialmente, alcanzando el 100% en muchas variedades. En cuanto a las especies silvestres probadas, algunas como *S. neorickii* y *S. chmielewskii* mostraron los síntomas más severos, y todas las demás mostraron niveles significativamente más bajos de síntomas. Mención especial merece la especie *S. habrochaites* con algunas entradas con síntomas casi ausentes junto con entradas con síntomas muy marcados. Las mejores entradas fueron las de *S. chilense* con plantas asintomáticas y negativas a TAS-ELISA. Estos resultados son prometedores ya que posibilitan la selección de materiales interesantes para el desarrollo de variedades de tomate tolerantes a ToLCNDV.

ABSTRACT

The *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), transmitted naturally by the whitefly *Bemisia tabaci*, causes significant economic damages in several crops of cucurbits (cucumber, melon, watermelon and zucchini) and *Solanaceae* (eggplant, potato and tomato) in many countries of the world. In Spain, since 2013, it is causing severe damage to melon and zucchini crops. This year, the infection of a tomato crop (*Solanum lycopersicum* L.) under greenhouse conditions with ToLCNDV in Almería (Spain) was also reported. The symptoms consisted of chlorotic spots and distortion of the veins in the middle and lower leaves. The availability of inoculation protocols and simple and efficient detection methods is necessary for the screening of tomato germplasm collections. We have evaluated the possibility of mechanical inoculation of ToLCNDV in tomato as a method of selection. As mentioned previously, this virus can not be transmitted in tomato by mechanical inoculation. Subsequently, a method of inoculation with *B. tabaci* was used. For this, using a traditional Valencian variety of tomato type 'De Penjar', we have tried different times of permanence of the plants in cages with a population of whitefly viruliferous (5, 10, 15 and 20 days). A percentage of 100% of infected plants was obtained with the 3 inoculation times used. Then we proceeded to test a collection of 8 traditional varieties belonging to different types of valencian traditional tomato varieties by inoculation with whitefly during the same periods of inoculation. In 6 of the 8 varieties, 100% of plants with systemic infection were obtained with all the inoculation periods, and in two varieties, 75% of infected plants were obtained after 5 days and 100% with the remaining treatments. These results indicate that a permanence of at least 10 days is necessary to obtain a 100% efficacy in ToLCNDV infection of susceptible plants. From this moment, the time of inoculation (permanence of the plants in the cages with viruliferous flies) was fixed in 10 days. Under these conditions, a screening was carried out in which a collection of 18 entries of wild species related to the cultivated tomato was used. This included 2 entries of *S. arcanum*, 2 of *S. chilense*, 2 of *S. chmielewskii*, 1 of *S. corneliomulleri*, 2 of *S. galapaguense*, 2 of *S. habrochaites*, 2 of *S. huaylasense*, 1 of *S. neorickii*, 1 of *S. pennellii*, 2 of *S. peruvianum* and 1 of *S. pimpinellifolium*. In this experiment, we used serological detection by TAS-ELISA analysis using a specific antiserum for the *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV). The 8 traditional varieties showed 100% of the plants with symptoms typical of ToLCNDV. Using WmCSV antiserum in symptomatic plants, virus detection increased substantially, reaching 100% in many varieties. As for the wild species tested, some such as *S. neorickii* and *S. chmielewskii* showed the most severe symptoms, and all the others showed significantly lower levels of symptoms. Special mention deserves the species *S. habrochaites* with some entries with almost absent symptoms along with entries with very marked symptoms. The best entries were from *S. chilense* with asymptomatic plants and negative to TAS-ELISA. These results are promising since they allow the selection of interesting materials for the development of tomato varieties tolerant to ToLCNDV.

RESUM

El virus de l'arriçat groc de la tomata Nova Delhi (*De Penjar* 'Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV), transmès naturalment per la mosca blanca *Bemisia tabaci*, causa danys econòmics importants en diversos cultius de cucurbitàcies (cogombre, meló, síndria i carbassó) i solanàcies (albergínia, patata i tomàquet) en molts països del món. A Espanya, des de 2013, està causant danys severos en els cultius de meló i carbassó. Aquest any, també es va informar sobre la infecció d'un cultiu de tomàquet (*Solanum lycopersicum* L.) sota hivernacle amb ToLCNDV a Almeria (Espanya). Els símptomes consistien en taques cloròtiques i distorsió de les venes en els fulls mitjanes i inferiors. La disponibilitat de protocols d'inoculació i mètodes de detecció simples i eficients és necessària per al cribratge de col·leccions de germoplasma de tomàquet. Hem avaluat la possibilitat de la inoculació mecànica de ToLCNDV en tomàquet com a mètode de selecció. Com s'havia esmentat anteriorment, aquest virus no es pot transmetre en tomàquet mitjançant inoculació mecànica. Posteriorment es va usar un mètode d'inoculació amb *B. tabaci*. Per a això, utilitzant una varietat valenciana tradicional de tomàquet tipus 'De penjar', s'han provat diferents temps de permanència de les plantes en gàbies amb una població de mosca blanca virulífera (5, 10, 15 i 20 dies). Es va obtenir un percentatge del 100% de plantes infectades amb els 4 temps d'inoculació utilitzats. Després es va procedir a provar una col·lecció de 8 varietats tradicionals pertanyents a diferents tipus de valencians tradicionals de tomàquet per inoculació amb mosca blanca durant els mateixos períodes d'inoculació. En 6 de les 8 varietats, es va obtenir un 100% de plantes amb infecció sistèmica amb tots els períodes d'inoculació, i en dues varietats, es va obtenir un 75% de plantes infectades després de 5 dies i el 100% amb els tractaments restants. Aquests resultats indiquen que és necessària una permanència d'almenys 10 dies per obtenir una eficàcia del 100% en la infecció per ToLCNDV de plantes susceptibles. A partir d'aquest moment, el temps d'inoculació (permanència de les plantes en les gàbies amb mosques virulíferes) es va fixar en 10 dies. En aquestes condicions, es va dur a terme un cribratge en el qual es va utilitzar una col·lecció de 18 entrades d'espècies silvestres relacionades amb el tomàquet conreat. Això va incloure 2 entrades de *S. arcanum*, 2 de *S. chilense*, 2 de *S. chmielewskii*, 1 de *S. corneliomulleri*, 2 de *S. galapaguense*, 2 de *S. habrochaites*, 2 de *S. huaylasense*, 1 de *S. neorickii*, 1 de *S. pennellii*, 2 de *S. peruvianum* i 1 de *S. pimpinellifolium*. En aquest experiment, fem servir la detecció serològica mitjançant una anàlisi de TAS-ELISA utilitzant un antisèrum específic per al virus de la tacat cloròtic del meló d'Alger (*Watermelon chlorotic stunt virus*, WmCSV). Les 8 varietats tradicionals van mostrar el 100% de les plantes amb símptomes típics de ToLCNDV. Pel que fa a la detecció del virus, utilitzant antisèrum específic de ToLCNDV, es va obtenir un percentatge molt baix de mostres positives (infectades) (menys del 5%). No obstant això, usant el antisèrum de WmCSV a les plantes simptomàtiques, la detecció del virus va augmentar substancialment, arribant al 100% en moltes varietats. Pel que fa a les espècies silvestres provades, algunes com *S. neorickii* i *S. chmielewskii* van mostrar els símptomes més severos, i totes les altres van mostrar nivells significativament més baixos de símptomes. Menció especial mereix l'espècie *S. habrochaites* amb algunes entrades amb símptomes gairebé absents juntament amb entrades amb símptomes molt marcats. Les millors entrades van ser les de *S. chilense* amb plantes asimptomàtiques i negatives a TAS-ELISA. Aquests resultats són prometedors ja que possibiliten la selecció de materials interessants per al desenvolupament de varietats de tomàquet tolerants a ToLCNDV.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor, Dr. Salvador Soler Aleixandre por la ayuda brinda en el desarrollo de este documento.

A D^a. María Rosario Figàs Moreno por la guía y orientación que supo ofrecerme durante el desarrollo de los experimentos.

A Elena Rosa, Cristina Casanova y Leandro Pereira por su colaboración y predisposición para compartir su experiencia y facilitarme los medios necesarios para llevar a cabo el proceso analítico en el laboratorio.

A María José Pérez por su ayuda en la gestión administrativa de este documento.

A Mary y Agustín por su apoyo incondicional.

Dedicado a

D. Jorge Paredes Reyes

D^a. Laura Mantilla Vargas

Guardo en mi corazón los preciosos momentos que pasé con Ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia económica del tomate	1
1.1.1 A nivel mundial	1
1.1.2 A nivel europeo	1
1.1.3 A nivel nacional	2
1.2 Descripción botánica y taxonomía del tomate	3
1.3 Importancia de las especies silvestres en la mejora genética del tomate.....	4
1.4 Virus del rizado de tomate de Nueva Delhi	7
1.4.1 Antecedentes y síntomas.....	7
1.4.2 Organización genómica y funcional	8
1.4.3 Transmisión.....	8
1.4.3.1 Ciclo viral.....	9
1.4.4 Diagnóstico y detección	10
1.4.4.1 Técnicas serológicas.....	10
1.4.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa.....	11
1.4.4.3 Hibridación molecular.....	11
2 OBJETIVOS	12
3 MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1 Material vegetal y diseño experimental	13
3.1.1 Determinación de la aptitud de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV	13
3.1.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca adecuado para el cribado eficaz de plantas de tomate frente al ToLCNDV	13
3.1.2.1 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal ‘De Penjar’	13

3.1.2.2	Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate	13
3.1.3	Comprobación de la eficiencia del método de inoculación con <i>Bemisia tabaci</i>	14
3.1.4	Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV.....	14
3.2	Condiciones de cultivo	15
3.2.1	Determinación de la aptitud de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV.	15
3.2.2	Determinación del período de inoculación con mosca blanca adecuado para el cribado eficaz de plantas de tomate frente al ToLCNDV	16
3.2.2.1	Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal "De Penjar"	16
3.2.2.2	Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate	17
3.2.3	Comprobación de la eficiencia del método de inoculación con <i>Bemisia tabaci</i>	17
3.2.4	Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV.....	17
3.3	Aislados y método de inoculación	17
3.3.1	Determinación de la aptitud de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV	17
3.3.2	Determinación del período de inoculación con mosca blanca adecuado para el cribado eficaz de plantas de tomate frente al ToLCNDV	18
3.3.2.1	Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal "De Penjar"	18
3.3.2.2	Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate	19
3.3.3	Comprobación de la eficiencia del método de inoculación con <i>Bemisia tabaci</i>	19
3.3.4	Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV.....	19

3.4 Sistemas de evaluación de la respuesta a la infección por ToLCNDV	20
3.4.1 Evaluación de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV	20
3.4.2 Evaluación del período de inoculación con mosca blanca para el cribado eficaz de plantas de tomate frente al ToLCNDV	21
3.4.2.1 Evaluación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal 'De Penjar'	21
3.4.2.2 Evaluación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate	21
3.4.3 Evaluación de la eficiencia del método de inoculación con <i>Bemisia tabaci</i>	21
3.4.4 Evaluación de la respuesta de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV	22
3.5 Análisis estadístico de los resultados	22
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1 Determinación de la aptitud de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV .	23
4.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal 'De Penjar'	23
4.3 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate.....	25
4.3.1 Colección de variedades tradicionales de tomate inoculadas con 5 DICM	25
4.3.2 Colección de variedades tradicionales de tomate inoculadas con 10 DICM	28
4.3.3 Colección de variedades tradicionales de tomate inoculadas con 15 DICM	30
4.3.4 Colección de variedades tradicionales de tomate con 20 DICM	32
4.3.5 Evaluación de los tres factores relacionados con la inoculación de una colección de variedades tradicionales de tomate con <i>B. tabaci</i>	34
4.4 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación con <i>Bemisia tabaci</i> con 10 DICM.....	36
4.5 Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV.....	40

5 CONCLUSIONES	45
6 BIBLIOGRAFÍA	46
7 ANEJOS	49
7.1 Composición del tampón de inoculación	49
7.2 Protocolo TAS-ELISA	49
7.3 Resultados de los experimentos del Trabajo de Fin de Máster	54
7.3.1 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal `De Penjar´	54
7.3.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate	58
7.3.3 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación con <i>Bemisia tabaci</i>	74
7.3.4 Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Encuadramiento taxonómico del tomate cultivado según Hunziker (1979).....	4
Tabla 1.2 Especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado	5
Tabla 3.1 Colección de variedades tradicionales de tomate utilizadas en el ensayo de cribado.	14
Tabla 3.2 Colección de entradas silvestres utilizadas en el ensayo de cribado.	15
Tabla 3.3 Niveles del índice de síntomas (IS) para la evaluación de la sintomatología presentada por las plantas de tomate inoculadas con ToLCNDV.	20
Tabla 4.1 Respuesta de la variedad ‘De Penjar’ al ToLCNDV mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> con diferentes días de inoculación (DICM). Evaluación temporal de síntomas.....	24
Tabla 4.2 Análisis ANOVA de los factores DICM y DDI para la respuesta de la variedad DP al ToLCNDV mediante inoculación con <i>B. tabaci</i>	25
Tabla 4.3 Respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 5 días. Evaluación temporal de síntomas.....	27
Tabla 4.4 Análisis ANOVA de los factores Variedad y DDI para la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV durante 5 días de inoculación con <i>B. tabaci</i> (5 DICM).....	27
Tabla 4.5 Respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 10 días. Evaluación temporal de síntomas.....	29
Tabla 4.6 Análisis ANOVA de los factores Variedad y DDI para la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV durante 10 días de inoculación con <i>B. tabaci</i> (10 DICM).	29
Tabla 4.7 Respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 15 días. Evaluación temporal de síntomas.....	31
Tabla 4.8 Análisis ANOVA de los factores Variedad y DDI para la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV durante 15 días de inoculación con <i>B. tabaci</i> (15 DICM).	32
Tabla 4.9 Respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 20 días. Evaluación temporal de síntomas.....	33
Tabla 4.10 Análisis ANOVA de los factores Variedad y DDI para la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV durante 20 días de inoculación con <i>B. tabaci</i>	34

Tabla 4.11 Análisis de varianza para los factores variedad, días de inoculación con mosca (DICM) y días después de la inoculación (DDI) relacionadas con la inoculación de una colección tradicional de plantas de tomate con <i>B. tabaci</i>	35
Tabla 4.12 Prueba de rangos múltiples para índice de síntomas por variedad.	35
Tabla 4.13 Prueba de rangos múltiples para índice de síntomas por DICM.	36
Tabla 4.14 Prueba de rangos múltiples para índice de síntomas por DDI.	36
Tabla 4.15 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación en la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.	38
Tabla 4.16 Análisis ANOVA de los factores Variedad y DDI para la comprobación de la eficiencia del método de inoculación en la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV durante 10 días de inoculación con <i>B. tabaci</i>	38
Tabla 4.17 Respuesta de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 10 días. Evaluación temporal de síntomas.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Distribución mundial de la producción y superficie cosechada de tomate en el año 2016.....	1
Figura 1.2 Distribución del volumen de la producción de tomate en los principales países europeos en el año 2016.....	2
Figura 1.3 Rendimientos del cultivo de tomate en los principales países europeos.....	2
Figura 1.4 Producción y rendimientos de tomate en España entre 2006 y 2016.....	3
Figura 1.5 Frutos, hojas y flores de tomate.....	4
Figura 1.6 Organización genómica del género Begomovirus.....	8
Figura 1.7 Insectos adultos virulíferos de mosca blanca con ToLCNDV en hojas de tomate y en el envés de una hoja de calabacín.....	9
Figura 1.8 Proceso de replicación de geminivirus.....	10
Figura 3.1 Distribución de plantas de calabacín dentro de la bandeja de PVC.....	16
Figura 3.2 Plantas de tomate de la variedad DP en estado de cuatro hojas verdaderas.....	16
Figura 3.3 Jaulas utilizadas para el mantenimiento del aislado de ToLCNDV.....	17
Figura 3.4 Inoculación mecánica con ToLCNDV en plantas de calabacín.....	18
Figura 3.5 Insectos adultos de <i>Bemisia tabaci</i> dentro de jaula.....	19
Figura 3.6 Escala de severidad de sintomatología producida por ToLCNDV adaptada.....	20
Figura 3.7 Evaluación de plantas luego de la inoculación por <i>Bemisia tabaci</i> virulífera.....	21
Figura 4.1 Síntomas en hoja de planta de calabacín de la variedad Verde Mata Compacta con infección sistémica por ToLCNDV.....	23
Figura 4.2 Respuesta de la variedad De Penjar al ToLCNDV mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> con diferentes días de inoculación (DICM). Evaluación temporal de síntomas.....	24
Figura 4.3 Porcentaje de plantas de la variedad De Penjar infectadas con ToLCNDV mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> con diferentes días de inoculación (DICM).....	25
Figura 4.4 Respuesta de 8 variedades tradicionales de tomate mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.....	26

Figura 4.5 Porcentaje de plantas de las variedades tradicionales infectadas con ToLCNDV con 5 días de inoculación con mosca blanca (DICM).....	28
Figura 4.6 Respuesta de 8 variedades tradicionales de tomate mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 10 días. Evaluación temporal de síntomas.....	28
Figura 4.7 Porcentaje de plantas de las variedades tradicionales infectadas con ToLCNDV con 10 días de inoculación con mosca blanca (DICM).....	30
Figura 4.8 Respuesta de 8 variedades tradicionales de tomate mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 15 días. Evaluación temporal de síntomas.....	31
Figura 4.9 Porcentaje de plantas de las variedades tradicionales infectadas con ToLCNDV con 15 días de inoculación con mosca blanca (DICM).....	32
Figura 4.10 Respuesta de 8 variedades tradicionales de tomate mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 20 días. Evaluación temporal de síntomas.....	33
Figura 4.11 Porcentaje de plantas de las variedades tradicionales infectadas con ToLCNDV con 20 días de inoculación con mosca blanca (DICM).....	34
Figura 4.12 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación en 8 variedades tradicionales de tomate mediante <i>B. tabaci</i> durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.....	37
Figura 4.13 Respuesta de una colección de 7 variedades tradicionales de tomate frente a la inoculación con <i>B. tabaci</i> 10 DICM.....	39
Figura 4.14 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación en el porcentaje de plantas infectadas de las variedades tradicionales con ToLCNDV con 10 días de inoculación con mosca blanca, en atención a TAS-ELISA.....	39
Figura 4.15 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación en la respuesta de 8 variedades tradicionales de tomate mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 10 días (10 DICM), en atención a TAS-ELISA. Evaluación a los 28 DDI.....	40
Figura 4.16 Respuesta de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 10 días. Evaluación temporal de síntomas.....	41

Figura 4.17 Porcentaje de plantas infectadas de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 10 días.	43
Figura 4.18 Porcentaje de plantas infectadas de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate infectadas con ToLCNDV con 10 días de inoculación con mosca blanca en atención a TAS-ELISA.....	43
Figura 4.19 Respuesta de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate mediante inoculación con <i>B. tabaci</i> durante 10 días, en atención a TAS-ELISA. Evaluación a los 28 DDI.	44

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia económica del tomate

1.1.1 A nivel mundial

El tomate es la hortaliza que más se produce en el mundo, registrándose en el año 2016 una producción de 177 millones de toneladas de las cuales el 60% se concentró en Asia, siendo, además, el continente que más superficie destina al cultivo. La marcada participación asiática se ha visto influenciada por la contribución de China, con el 32% en la producción mundial de tomate.

El continente europeo registró el 14% del volumen de producción mundial, seguido por África con el 11%. Existe entre estos dos continentes una marcada diferencia en la superficie cosechada que evidencia los diferentes niveles tecnológicos asociados al cultivo del tomate en estos dos continentes.

El continente americano aporta el 15% de la producción mundial, siendo América del Norte el subcontinente que más contribuye a este volumen de producción (figura 1.1) (FAO, 2017).

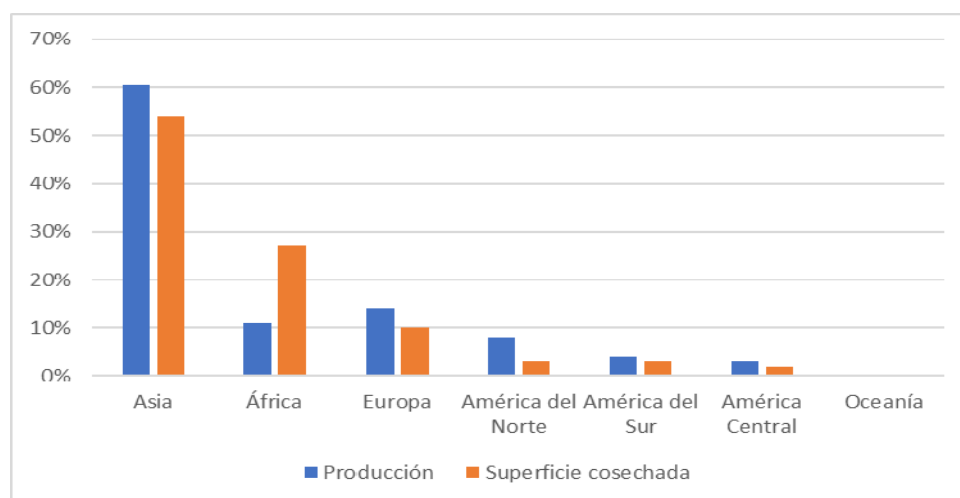


Figura 1.1 Distribución mundial de la producción y superficie cosechada de tomate en el año 2016.

Fuente: (FAO, 2017)

1.1.2 A nivel europeo

El volumen de producción de tomate a nivel europeo en el año 2016 llegó a 24,16 millones de toneladas (FAO, 2017), siendo Italia el primer productor con 6,43 millones de toneladas (27% del total europeo). Le siguen España con 4,67 millones de toneladas (19%), Portugal con 1,69 millones de toneladas (7%), Grecia con 1,04 millones de toneladas (4%) y

Países Bajos con 900 mil toneladas (4%) (figura 1.2). Sin embargo, este último país presenta los mayores rendimientos dentro de la Unión Europea con unas 507 t/ha (figura 1.3).

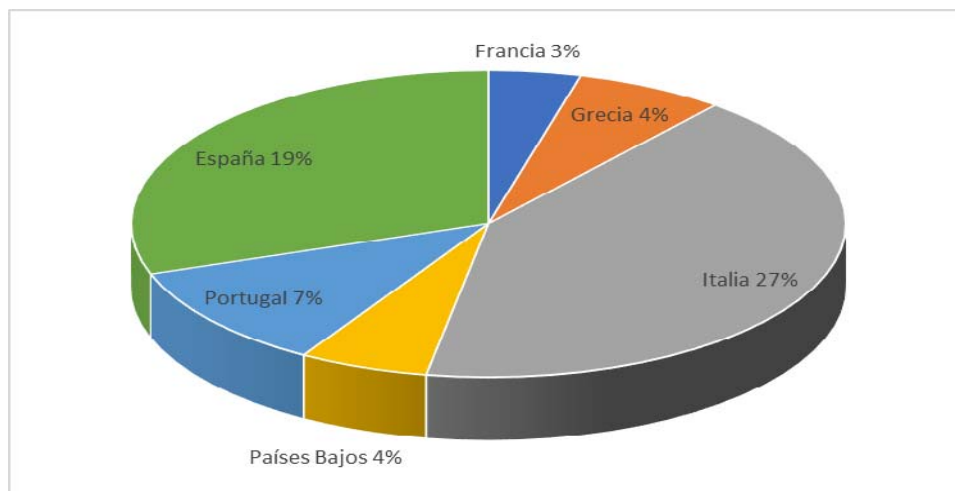


Figura 1.2 Distribución del volumen de la producción de tomate en los principales países europeos en el año 2016.

Fuente: (FAO, 2017)

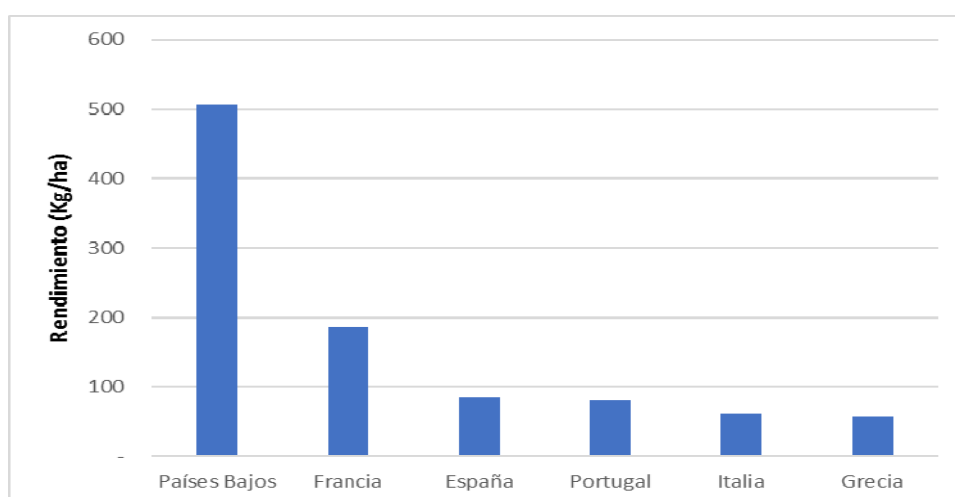


Figura 1.3 Rendimientos del cultivo de tomate en los principales países europeos.

Fuente: (FAO,2017)

1.1.3 A nivel nacional

De acuerdo con la información de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción de tomate en España creció a una tasa anual promedio de 1,43% en el período comprendido entre los años 2006 y 2016 para ubicarse en un volumen de 4,67 millones de toneladas en el año 2016. El rendimiento en este cultivo, de forma paralela, en la última década también ha experimentado una clara tendencia al alza pasando de 67 t/ha en 2006 a 86 t/ha en 2016 (22% de incremento) (figura 1.4) (FAO, 2017).

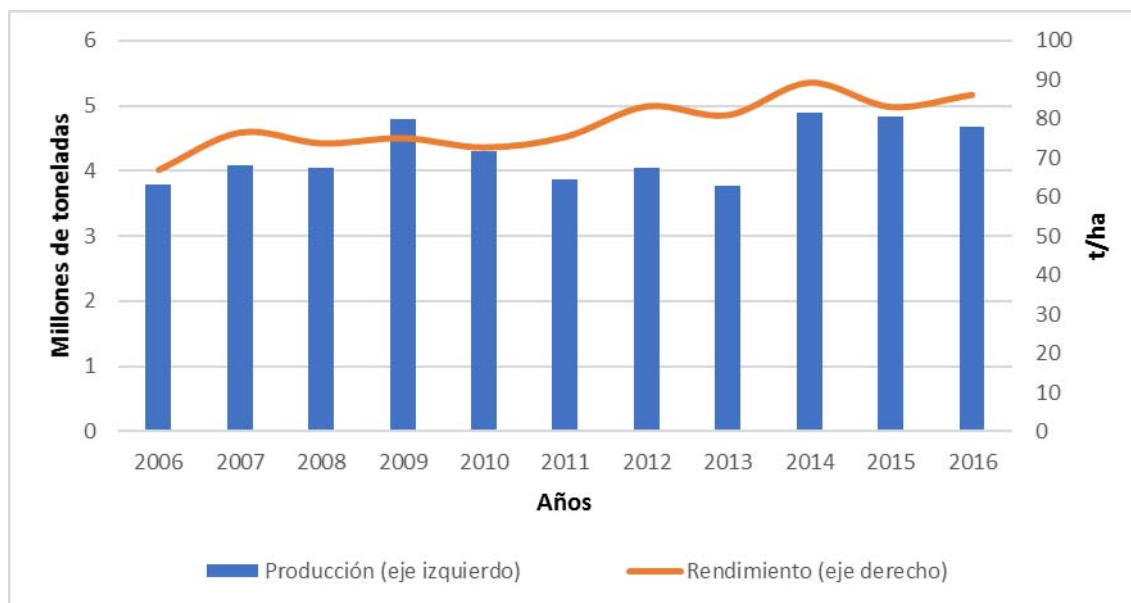


Figura 1.4 Producción y rendimientos de tomate en España entre 2006 y 2016.

Fuente: (FAO, 2017)

España continúa siendo el mayor productor de tomate en fresco de la Unión Europea con una producción estimada para el año 2016 de 2.000.000 de toneladas anuales. Las principales áreas productoras son Almería con 725.000 toneladas, la Región de Murcia aporta alrededor de 325.000 toneladas, le sigue Canarias con 200.000 toneladas, Aragón y Navarra con unas 150.000 toneladas cada una. En cuanto al comercio exterior de tomate por parte de España, destacan las exportaciones a países de la Unión Europea, principalmente a Alemania, Francia, Países Bajos, Reino Unido y Polonia (MAPAMA, 2008).

1.2 Descripción botánica y taxonomía del tomate

La primera descripción botánica del tomate la realizó Pier Andrea Mattioli, del jardín botánico de Padua en Italia, quien publicó su herbario en 1554. El tomate se ha encuadrado taxonómicamente dentro de la familia de las Solanáceas, con excepción de su ubicación genérica que ha generado controversia. Así, inicialmente Linnaeus (1753) clasificó al tomate cultivado dentro del género *Solanum*. Un año más tarde, Miller (1754) separó ambos géneros, pasando el tomate a ser clasificado como *Lycopersicon esculentum* (Nuez, 1995). La reciente revisión taxonómica, apoyada en estudios de caracteres morfológicos, relaciones filogenéticas y distribución geográfica ha llevado a que los tomates se hayan reintegrado en el género *Solanum*, pasando a denominarse el tomate cultivado como *Solanum lycopersicum* (tabla 1.1) (Grzebelus *et al.*, 2015).

Tabla 1.1 Encuadramiento taxonómico del tomate cultivado según Hunziker (1979)

Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Solanum lycopersicum</i>

El tomate es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas cuya forma de crecimiento es simpodial. El tallo es de color verde y grueso, pubescente, anguloso y del cual se desarrollan yemas axilares en ejes sucesivos. Las hojas de tomate son de tipo pinnado compuestas, los folíolos son peciolados y lobulados con bordes dentados. Las flores son hermafroditas y se agrupan en un número variable en inflorescencias de tipo racemoso. Posee un sistema radicular amplio, constituido por una raíz principal, provista de una gran cantidad de ramificaciones secundarias y reforzado por un gran número de raíces adventicias surgidas desde la base del tallo. El fruto es una baya bi o plurilocular unido a la planta por un pedicelo con engrosamiento articulado. Puede tener forma achatada, redondeada, acostillada o en forma de pera, siendo muy variable en forma y tamaño según la variedad cultivada (figura 1.5) (Maroto, 2002).

**Figura 1.5 Frutos, hojas y flores de tomate.**

1.3 Importancia de las especies silvestres en la mejora genética del tomate

En los programas de mejora, es preciso disponer de recursos fitogenéticos relacionados con la especie con la cual se está trabajando. En este sentido, es importante disponer de dicho material que originalmente se encuentra en los centros de diversidad para su utilización en la mejora genética de las plantas.

Una fracción importante de esta variabilidad se encuentra actualmente conservada en bancos de germoplasma de distintos centros de investigación como el National Plant Germplasm System del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), el N. I. Vavilov Research Institute of Plant Industry (VIR) en San Petersburgo (Rusia), el Centre for Genetics Resources The Netherlands (CGN) en Wageningen (Holanda), el Tomato Genetics Resource Center en Davis, California, Estados Unidos y el Banco de Germoplasma del Centro de

Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) de la Universidad Politécnica de Valencia, España (Soler and Nuez, 2004).

En la tabla 1.2 se exponen las especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado que han sido tradicionalmente utilizadas en programas de mejora (Nuez, 1995).

Tabla 1.2 Especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado

Especie	Distribución	Preferencias ecológicas	Características interesantes
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>Cerasiforme</i> (Dun.) Gray	Regiones tropicales; zona nativa: Ecuador/Perú	Condiciones húmedas muy variadas. Mala hierba en terrenos de cultivo recientes.	Tolerancia a la humedad, resistencia a los hongos de la marchitez, la podredumbre de las raíces y la viruela.
<i>S. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill	Costa del Perú, interandina, Perú septentrional; Ecuador.	Mala hierba en los campos cultivados de los valles costeros peruanos. Aluviones interandinos secos.	Contribuyó a la mejora del color, la calidad de los frutos y la resistencia a las enfermedades de los tomates cultivados.
<i>S. cheesmaniae</i> Riley	Endémica del Archipiélago de Galápagos	La subespecie <i>minor</i> prefiere elevaciones escasas; se extiende hacia la zona litoral salina.	Tolerancia a la sal; genes para la retención del fruto y pericarpio grueso.
<i>S. galapagense</i>	Archipiélago de las Islas Galápagos	Adaptada a zonas áridas	Esta especie posiblemente se está hibridando con <i>S. lycopersicum</i> o <i>S. pimpinellifolium</i> en islas habitadas y también está amenazada por animales salvajes.
<i>S. arcanum</i> Peralta	Perú, Amazonas: base occidental del cerro Calla, 9 km al Este de Balsas en el camino a Leimebamba.	Prefiere los medios secos.	Los genes para la resistencia al mildiu polvoriento se han identificado en <i>S. arcanum</i> (LA2172, Bai et al., 2004).
<i>S. neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	Sur de Perú (Departamento de Apurímac) al sur de Ecuador (Provincia del Azuay) en valles interandinos secos de 1950-3000 msnm.	Prefiere los medios secos.	<i>Solanum neorickii</i> es hermana de <i>S. chmielewskii</i> y, en ausencia de flores, es difícil distinguirlo.

Especie	Distribución	Preferencias ecológicas	Características interesantes
<i>S. chmielewskii</i> C.M Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle	Zonas rocosas del Perú (1900-3100 msnm.)	Hábitats húmedos, aunque bien drenados, ambientes rocosos.	Alto contenido de azúcar.
<i>S. habrochaites</i> Humb. Y Bonpl.	Perú central al Ecuador septentrional, 500-3300 msnm.	Prefiere las zonas húmedas y bien drenadas; llega a grandes altitudes.	Puede ser tolerante al frío y las heladas; resistente a insectos nocivos.
<i>S. huaylasense</i> Peralta y S. Knapp	En las laderas rocosas alrededor del Callejón de Huaylas a lo largo del Río Santa en el Departamento de Ancash, Perú y en el drenaje adyacente del Río Fortaleza; 1700-3000 msnm.	Crece en acantilados rocosos	<i>Solanum huaylasense</i> es una prioridad para la conservación debido a la escasez de colecciones y la falta de conocimiento sobre el estado de la población.
<i>S. peruvianum</i> (L.) Mill.	Amplia distribución en el Perú, penetrando en Chile septentrional.	Variadas	Resistencia a virosis, micosis y nemátodos. No bien estudiado.
<i>S. chilense</i> Dun.	Perú meridional y parte más septentrional de Chile.	Prefiere los medios muy secos.	Economía hídrica basada en un sistema radicular profundo.
<i>S. corneliomuelleri</i> J.F. Macbr	Elevaciones medias a altas en la vertiente occidental de los Andes desde el centro (cerca de Lima) hasta el sur de Perú	Prefiere los medios muy secos.	Análisis con marcadores AFLP (Spooner et al., 2005) sugieren que <i>S.</i> <i>corneliomuelleri</i> y <i>S.</i> <i>peruvianum</i> se están hibridando en la parte sur del Perú.
<i>S. pennellii</i> (Corr.) D'Arcy	Elevaciones medias próximas a la costa del Perú central.	Adaptada a zonas áridas; sujeta al rocío y la niebla.	Resistente a la sequía; absorbe la humedad atmosférica por las hojas.

Para el desarrollo de variedades de hortalizas resistentes a enfermedades, es muy importante tener acceso a colecciones de recursos fitogenéticos relacionados con la especie hortícola con la que está trabajando. La cruzabilidad y proximidad genética del recurso fitogenético con la variedad a mejorar son aspectos claves en la utilización de las fuentes de resistencia. Los mejoradores empiezan siempre ensayando el comportamiento de variedades pertenecientes a la especie cultivada, pues ello facilita la cruzabilidad y evita la introducción de genoma indeseable. Sin embargo, frecuentemente no se encuentra resistencia en la especie cultivada y es necesario acudir a especies silvestres relacionadas. Así, en tomate aproximadamente un 75% de los genes de resistencia han sido identificados en especies silvestres (Soler and Nuez, 2004).

1.4 Virus del rizado de tomate de Nueva Delhi

1.4.1 Antecedentes y síntomas

La producción del sector agrícola se encuentra limitada por la incidencia de virus que provocan patologías que ponen en riesgo las cosechas de cultivos representativos de cucurbitáceas y solanáceas en el Sur de España. Así, el cultivo del tomate se suele ver afectado por virosis como las causadas por el virus del mosaico del tomate (ToMV), el virus del bronceado del tomate (TSWV), el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV), así como el complejo de virus causantes del rizado de las hojas del tomate denominado la enfermedad del rizado amarillo del tomate TYLCD. Al menos cuatro de estas especies están asociadas con epidemias en la cuenca mediterránea, siendo estos: el virus del mosaico del rizado amarillo de las hojas de tomate (TYLCV), el virus de Cerdeña del mosaico del rizado amarillo de las hojas de tomate (TYLCSV), la especie recombinante del virus del mosaico del rizado amarillo de las hojas de Málaga (TYLCMaIV) y el virus Axarquía del mosaico del rizado amarillo de las hojas de tomate (TYLCAxV) pertenecientes al género *Begomovirus* (Monci and Sa, 2002; García-Andrés *et al.*, 2006).

Durante el año 2013, en el sur de España, se observaron síntomas de una nueva enfermedad viral en calabacín, en campo y en invernadero. Estos síntomas incluían el rizado de las hojas jóvenes, la aparición de amarilleo muy intenso, detención del crecimiento de las plantas afectadas y rizadura suave en la piel del fruto joven. Se trataba de una cepa del virus del rizado de tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV), un virus estrechamente relacionado con el virus del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV).

Además de en calabacín, se detectó el ToLCNDV en otros cultivos españoles de cucurbitáceas tales como calabaza, melón, pepino, sandía y recientemente en tomate, ampliándose su distribución a otras zonas de cultivo. En este caso, se observó en etapas iniciales de la infección un detenimiento en el crecimiento de la planta. Así, la planta adoptó una configuración arrepollada y se producía una disminución ostensible de la producción o incluso la planta no llegaba a dar frutos (Font, 2016).

El ToLCNDV fue detectado por primera vez en tomate en el norte de la India en el año de 1995 (Srivastava *et al.*, 1995). El virus ha invadido otros países asiáticos como Pakistán en el año 2004, Bangladesh en el 2005, Tailandia en el 2008, Indonesia en el 2011 e Irán en el 2016 (Simón *et al.*, 2017).

El primer reporte de infección por ToLCNDV en tomate bajo invernadero en España, fue en la Provincia de Almería, en septiembre del 2013. El virus se manifestó en el follaje, presentando síntomas de mosaicos cloróticos y fruncimiento de las hojas (Ruiz *et al.*, 2015). El ToLCNDV causa daños severos en tomate, que se manifiestan con una atrofiamiento generalizado de la planta, acucharamiento de las hojas tanto por el haz como por el envés, arrugamiento de las hojas, amarillamiento intervenal y venas aclaradas (Fortes *et al.*, 2016). En este sentido, en el presente trabajo se plantea la búsqueda de fuentes de resistencia al ToLCNDV en tomate.

1.4.2 Organización genómica y funcional

El ToLCNDV, pertenece al género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*). El virus tiene dos genomas de DNA circular de cadena sencilla de aproximadamente 2,7 kb cada uno (DNA-A y DNA-B) (Figàs *et al.*, 2017). Los dos componentes genómicos comparten una región conservada denominada región intergénica que codifica las proteínas virales. Además de estos dos componentes, algunos aislados de ToLCNDV tienen asociados DNAs satélites de cadena sencilla, circulares de aproximadamente 1,3 kb, denominados DNA β que dependen de los DNAs A y B para su replicación y contienen una secuencia conservada (Juarez *et al.*, 2014).

Las características básicas de la organización del genoma del ToLCNDV como se muestra en la figura 1.6, son la presencia de los genes V1/AV1, C1/AC1, C2/AC2, C3/AC3 y C4/AC4 que participan en la codificación de la proteína de cubierta en el componente circular DNA-A, así como en la replicación, activación de la transcripción, replicación, movimiento y expresión sintomática del virus. Mientras que en el DNA-B se expresan los genes BV1 y BC1 que actúan de manera cooperativa y están relacionados con el movimiento célula a célula del virus en el hospedante (Leke *et al.*, 2015; Malathi *et al.*, 2017).

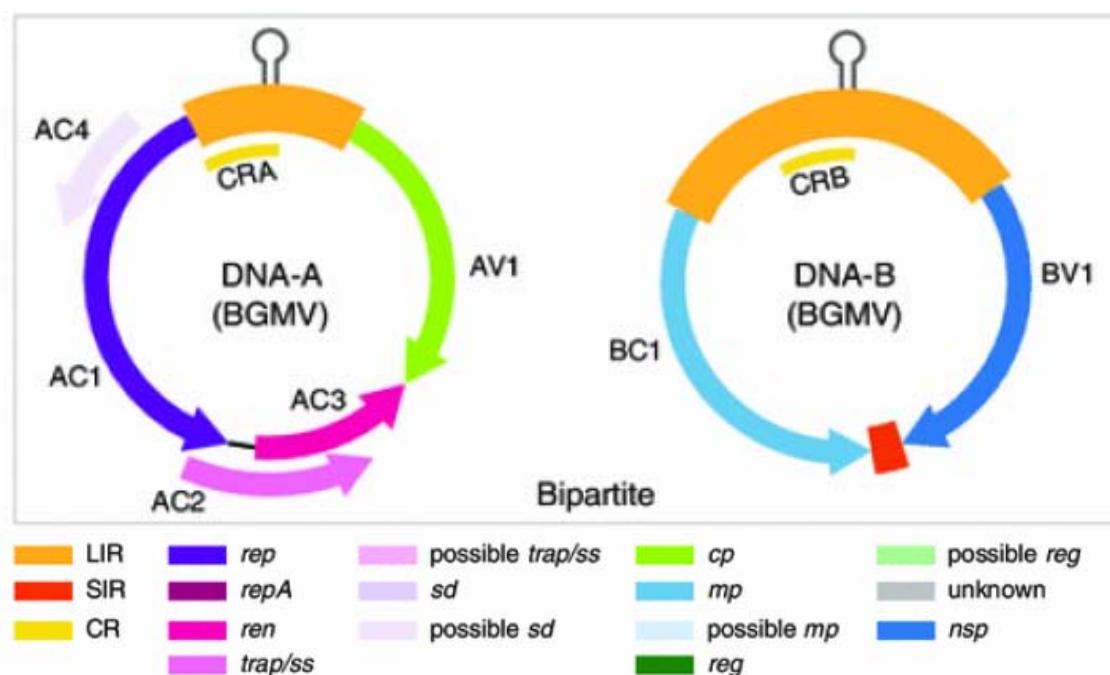


Figura 1.6 Organización genómica del género Begomovirus.

Fuente: (Varsani *et al.*, 2014).

1.4.3 Transmisión

La transmisión del ToLCNDV en tomate se da a través del insecto vector *Bemisia tabaci* (Rosen *et al.*, 2015). Este insecto, altamente polífago, pertenece a la familia *Aleyrodidae*, del orden Hemiptera y se alimenta de las hojas ubicándose en el envés de estas (figura 1.7).

Bemisia tabaci, realiza la transmisión de *begomovirus* de manera persistente, esto es, durante toda vida del adulto. Durante el proceso de alimentación, la mosca puede adquirir el virus al entrar en contacto con el floema de plantas infectadas. El floema infectado, transporta viriones que ingresarán en el aparato bucal del tipo picador-chupador y pasan a través del canal alimenticio en el estilete, alcanzando el esófago y el intestino. En una segunda etapa, los viriones cruzan a la hemolinfa por el intestino medio y alcanzan las glándulas salivares. Cuando la mosca nuevamente necesita alimentarse de otras plantas, se ubicará preferentemente en el envés de las hojas y perforará las células para succionar la savia de los tejidos, transmitiéndose de esa manera el virus. La transmisión del virus ToLCNDV requiere un período mínimo de adquisición a través de la alimentación de unas 24 horas (Maruthi *et al.*, 2005). Los *begomovirus* no se transmiten a los descendientes de una mosca virulífera, sino que se adquiere en las etapas larvarias (Tellez *et al.*, 2017).

La transmisión se produce de manera persistente y circulativa. Es decir, que la mosca adquiere el virus una vez que se ha alimentado de plantas enfermas, pasando este por su aparato digestivo y tras un período de latencia termina acumulándose en las glándulas salivares. Llegado a este punto el insecto con ayuda del estilete, se localiza en la epidermis de la hoja para succionar el floema de la planta, de esa manera pueda alimentarse mientras inyecta viriones en el tejido vascular (Navas-Castillo *et al.*, 2011).



Figura 1.7 Insectos adultos virulíferos de mosca blanca con ToLCNDV en hojas de tomate y en el envés de una hoja de calabacín.

1.4.3.1 Ciclo viral

El ciclo viral del ToLCNDV se inicia con la entrada de partículas virales en el citoplasma, dentro del cual el virión se desensambla y el genoma es trasladado al núcleo celular, en el cual el virus se replica haciendo una conversión de ssDNA a dsDNA. A partir del dsDNA se sintetizan los factores virales Rep y REN y factores propios de la planta que intervienen en la síntesis del nuevo ssDNA a partir del dsDNA. Posteriormente, el factor Rep reprime su propia transcripción, facilitando la expresión de la proteína TrAP que activa a las proteínas CP y NSP. El nuevo ssDNA puede entrar de nuevo en el ciclo de replicación o ser encapsidado por la proteína de cubierta, formándose nueva partícula viral. El DNA viral es transportado por la

proteína NSP fuera de la envoltura nuclear y por la proteína de movimiento a través de los plasmodesmos constituyendo el movimiento célula a célula del virus (Fondong, 2013).

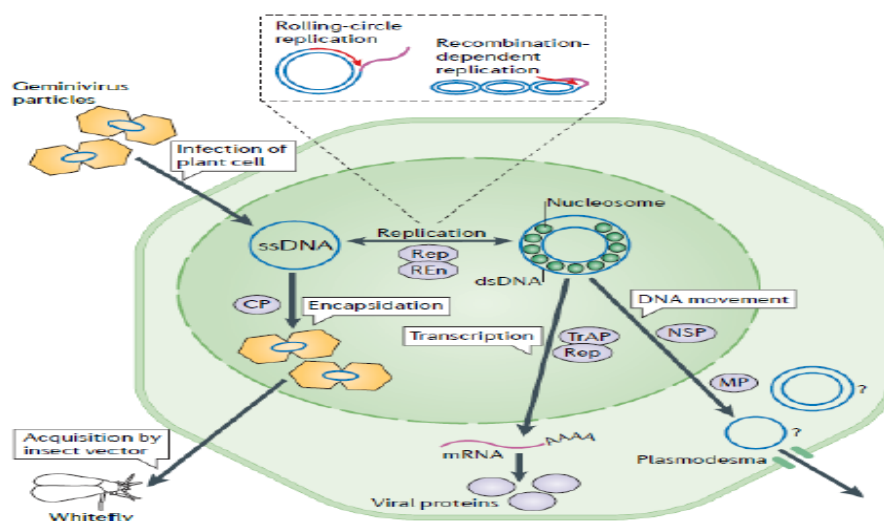


Figura 1.8 Proceso de replicación de geminivirus.

Fuente: (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

1.4.4 Diagnóstico y detección

1.4.4.1 Técnicas serológicas

Estas técnicas están basadas en la comprobación de la presencia de un patógeno, en este caso un virus, a partir de la detección de alguna de las proteínas del mismo. Así, se utiliza la técnica ELISA (Enzyme-Liked Immunosorbent Assay) en la cual un antígeno (proteína del virus) inmovilizado se detecta a través de su unión con un anticuerpo ligado a una enzima que es capaz de generar un producto detectable por espectrofotometría (Llácer, 1996).

La obtención de antisueros requiere de la purificación de la proteína o proteínas virales a detectar, para la generación en un hospedante adecuado de los anticuerpos (antisuero) correspondiente. Sin embargo, la obtención de antisueros específicos de *begomovirus* se ve limitada debido a las bajas concentraciones de virus presente en las plantas.

Los viriones presentan bajo poder inmunogénico y la proteína de cubierta de los *geminivirus* transmitidos por moscas blancas presentan un alto grado de homología entre ellos, lo que conlleva a la obtención de reacciones cruzadas entre los distintos anticuerpos monoclonales y policlonales disponibles para distintos *begomovirus* (Font, 2003).

En un ensayo de inoculación mecánica con ToLCNDV en pepino, melón y calabacín, se evaluó la eficiencia de la infección, para lo cual se utilizaron diferentes métodos de detección. Entre las técnicas de diagnóstico, se evaluó la detección serológica a partir de antisueros mono y policlonales (ToLCNDV, TYLCV, SLCV y WmCSV). El ensayo concluye señalando que existen diferencias significativas entre las pruebas serológicas evaluadas, debido a que se presentaron diferencias en el porcentaje de plantas que fueron positivas al realizar el Test ELISA. Basados

en este hecho, los resultados sugieren el uso del antisuero WmCSV para la detección serológica de ToLCNDV en melón y calabacín (Figàs *et al.*, 2017).

1.4.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA, el requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima-polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad fragmento amplificada se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de DNA (Pérez de Castro, 2005).

1.4.4.3 Hibridación molecular

La hibridación molecular se basa en la unión complementaria de ácidos nucleicos (ADN o ARN). Estas técnicas se utilizan para detectar una molécula diana partiendo de sondas de DNA o RNA sintetizadas y marcadas. La sonda y la secuencia diana forman un híbrido que será detectado gracias a que la sonda está marcada radioactivamente o no. La muestra con el ácido nucleico diana se macera en solución alcalina y se fija a un soporte sólido que puede ser una membrana de nitrocelulosa o de nylon (Conti *et al.*, 2001).

Es una técnica de alta sensibilidad, sencilla y de bajo coste, especialmente útil cuando se requiere el diagnóstico y detección de un virus en un gran número de muestras. La capacidad de detección depende tanto del diseño de la sonda como de las condiciones más o menos restrictivas de la hibridación. Es posible diferenciar entre especies de virus, diseñando sondas sobre zonas altamente variables del genoma y bajo unas condiciones de hibridación muy restrictivas (Landeira, 2016).

2 OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido el establecimiento de un sistema experimental de inoculación eficaz con el ToLCNDV en tomate y la búsqueda de fuentes de resistencia al mismo mediante el cribado de una colección de variedades de tomate y otra de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV. Con este fin se han realizado distintas actividades:

2.1.- Determinación de la aptitud de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV.

2.2.- Determinación del período de inoculación con mosca blanca adecuado para el cribado eficaz de plantas de tomate frente al ToLCNDV.

2.3.- Cribado de una colección de variedades tradicionales de tomate para determinar su comportamiento frente al ToLCNDV.

2.4.- Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y diseño experimental

3.1.1 Determinación de la aptitud de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV

En una primera fase se determinó la aptitud de un sistema de inoculación mecánica con el ToLCNDV, partiendo de plantas de calabacín (*Cucurbita pepo* subs. *Pepo*) de la variedad Verde Mata Compacta (VMC) como fuente de inóculo. Así mismo se partió de un conjunto de 64 plantas de una variedad tradicional valenciana del tipo varietal “De Penjar” (DP). Estas 64 plantas fueron organizadas en 8 bandejas de dimensiones 36 x 16 cm, cada una conteniendo 8 plantas de tomate en estado de cuatro hojas verdaderas.

3.1.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca adecuado para el cribado eficaz de plantas de tomate frente al ToLCNDV

3.1.2.1 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal ‘De Penjar’

Se partió de 64 plantas de tomate del tipo varietal DP. Las plantas se distribuyeron en 8 bandejas de dimensiones 36 x 16 cm. En cada bandeja se ubicaron 8 plantas de tomate en estado de cuatro hojas verdaderas.

3.1.2.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos en el apartado 3.1.2.1, se procedió a la evaluación de 64 plantas procedentes de una colección de 8 variedades tradicionales de tomate (tabla 3.1), incluyendo como control positivo a la variedad DP. Las plantas se distribuyeron aleatoriamente en 8 bandejas de 36x16 cm, que fueron ubicadas dentro de las jaulas.

Tabla 3.1 Colección de variedades tradicionales de tomate utilizadas en el ensayo de cribado.

Tipo varietal	Código entrada	Localidad colecta	% germinación
Redondo rojo	AG-3	Agullent-3	90,00
Valenciano-rosado	BOC-1	Bocairent-1	94,00
Pimiento	FONT-1	Font de la Figuera-1	93,00
De Colgar	LJ-4	La Jana-4	88,00
Plana	O-3	Oriola-3	90,00
Valenciano	SJA-1	Sant Joan de Alacant-1	92,00
Valenciano	TT-1	Torres-Torres-1	88,00
De Penjar	DP	Almería	98,00

3.1.3 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación con *Bemisia tabaci*

Se utilizaron las mismas variedades tradicionales señaladas en el apartado 3.1.2.2.

3.1.4 Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV

Se probó una colección de 18 entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado (tabla 3.2), formada por: 2 entradas de *Solanum arcanum*, 1 entradas de *S. corneliumullerri*, 2 entradas de *S. chilense*, 2 entradas de *S. chmielewskii*, 2 entradas de *S. galapagense*, 2 entradas de *S. habrochaites*, 2 entradas de *S. huaylasense*, 1 entrada de *S. neorickii*, 1 entrada de *S. pimpinellifolium*, 1 entradas de *S. pennellii*, y 2 entradas de *S. peruvianum*.

Tabla 3.2 Colección de entradas silvestres utilizadas en el ensayo de cribado.

Especie	Entrada	País	Localidad	Departamento	% germinación
<i>Solanum arcanum</i>					
	LA1346	Perú	Casmiche	La Libertad	56,00
	LA1626	Perú	Mouth of Rio Rupac	Ancash	28,00
<i>Solanum corneliomulleri</i>					
	LA1274	Perú	Pacaibamba	Lima	28,00
<i>Solanum. chilense</i>					
	LA1960	Perú	Río Osmore	Moquegua	64,00
	LA1932	Perú	Minas de Acari	Arequipa	20,00
<i>Solanum chmielewskii</i>					
	LA1317	Perú	Hacienda Pajonal	Ayacucho	52,00
	LA1028	Perú	Casinchihua	Apurimac	20,00
<i>Solanum galapagense</i>					
	LA0438	Ecuador	Isabela: costa en Villamil	Islas Galápagos	16,67
	LA0483	Ecuador	Fernandina: costado del cráter	Islas Galápagos	58,33
<i>Solanum habrochaites</i>					
	LA1347	Perú	Empalme Otusco	La Libertad	16,00
	LA1223	Ecuador	Alausí	Chimborazo	41,67
<i>Solanum huaylasense</i>					
	LA1982	Perú	Huallanca	Ancash	12,00
	LA1365	Perú	Caranquillo	Ancash	24,00
<i>Solanum neorickii</i>					
	LA1322	Perú	Limatambo	Cusco	66,67
<i>Solanum pimpinellifolium</i>					
	LA0400	Perú	Hacienda Buenos	Piura	66,67
<i>Solanum pennellii</i>					
	LA0716	Perú	Ático	Arequipa	41,67
<i>Solanum peruvianum</i>					
	LA0446	Perú	Lomas de Atiquipa	Arequipa	32,00
	LA0752	Perú	Sisacaya	Lima	8,00

3.2 Condiciones de cultivo

3.2.1 Determinación de la aptitud de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV.

Las semillas de calabacín fueron sembradas dentro de placas Petri de 9 cm de diámetro en las que previamente se introdujo papel de filtro y algodón humedecido en agua destilada. Las placas permanecieron dentro de una cámara de cultivo en condiciones controladas de temperatura (25°C), humedad relativa (70%), fotoperíodo (16 horas luz/8 horas oscuridad), intensidad luminosa (70 μ E/m²s). Al llegar al estado de cotiledón, se trasplantaron en macetas de polietileno de dimensiones 9x9x9 cm con turba rubia enriquecida. Estas

macetas se distribuyeron en bandejas de PVC (figura 3.1) y se trasladaron hacia la cámara anteriormente citada.



Figura 3.1 Distribución de plantas de calabacín dentro de la bandeja de PVC.

Las semillas de tomate de la variedad DP, fueron desinfectadas en una solución de Sodio Trifosfato al 10% durante 3 horas en agitación, se enjuagaron con agua destilada, luego las semillas pasaron por una solución de lejía al 30% durante una hora en agitación, se enjuagaron con agua destilada. La siembra se realizó en las mismas condiciones descritas para el calabacín. Una vez que las plántulas se encontraron en estado de cuatro hojas verdaderas (figura 3.2), se procedió a inocular mecánicamente con el aislado del virus del ToLCNDV.



Figura 3.2 Plantas de tomate de la variedad DP en estado de cuatro hojas verdaderas.

3.2.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca adecuado para el cribado eficaz de plantas de tomate frente al ToLCNDV

3.2.2.1 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal “De Penjar”

Las semillas de tomate de la variedad DP, se desinfectaron, sembraron y posteriormente se trasplantaron de forma similar a la descrita en el apartado 3.2.1.

3.2.2.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate

Las semillas de la colección de variedades tradicionales de tomate, se acondicionaron de la misma forma que se describió en el apartado 3.2.1.

3.2.3 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación con *Bemisia tabaci*

Las semillas de tomate de las variedades tradicionales recibieron el mismo tratamiento descrito en el punto 3.2.1.

3.2.4 Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV

Las semillas de tomate de especies silvestres, recibieron el mismo tratamiento descrito en el apartado 3.2.1. En la figura 3.3 se muestran las plantas de tomate de especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado ubicadas dentro de las jaulas.



Figura 3.3 Jaulas utilizadas para el mantenimiento del aislado de ToLCNDV.

3.3 Aislados y método de inoculación

3.3.1 Determinación de la aptitud de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV

A partir de un aislado comercial liofilizado (DSMZ PV-1111) de ToLCNDV, se procedió a su inoculación mecánica sobre plantas de calabacín VMC. El material congelado se trituró en un mortero con ayuda de un mazo mientras se añadía tampón de inoculación (Anejo 7.1) en proporción 1:10 (peso: volumen) hasta obtener una pasta homogénea a la cual se añadía carborundum de tamiz ASTM nº 600 al 1% y carbón activo al 1%. La inoculación se efectuó

mecánicamente con ayuda de un aplicador de algodón sobre la superficie foliar de las plantas de calabacín, cuando estas habían alcanzado el estado de cotiledones desplegados (figura 3.4).



Figura 3.4 Inoculación mecánica con ToLCNDV en plantas de calabacín.

Estas plantas de calabacín infectadas con el aislado PV-1111 fueron las que se utilizaron como fuente de inóculo en los distintos experimentos realizados.

Así, para probar la aptitud de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV, se partió de hojas de calabacín infectadas. Estas se trituraron en un mortero con ayuda de un mazo como se describió anteriormente. Realizándose la inoculación mecánica de las plantas de la variedad DP cuando presentaban cuatro hojas verdaderas.

3.3.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca adecuado para el cribado eficaz de plantas de tomate frente al ToLCNDV

3.3.2.1 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal ‘De Penjar’

El estudio se realizó en la cámara de cultivo climatizada citada anteriormente, en la cual se ubicaron cuatro jaulas cubiertas por malla anti-trips de dimensiones 60x60x60 cm. Además, se contó con mosca blanca limpia donada por el Dr. Beitia del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Para el desarrollo de este experimento se puso en marcha una población de *B. tabaci* infectiva para el ToLCNDV, para lo cual se introdujeron en las jaulas, plantas nuevas de calabacín, otras previamente inoculadas mecánicamente con el aislado PV-1111, con síntomas del virus, e insectos adultos de mosca blanca (figura 3.5). Una vez se dispuso de una población de mosca infectiva abundante se procedió a la inoculación de la variedad DP. Para esto, se introdujeron en las jaulas 64 plantas de tomate DP distribuidas en bandejas como se describió en el apartado 3.1.2.1.



Figura 3.5 Insectos adultos de *Bemisia tabaci* dentro de jaula.

A los 5 días de inoculación con mosca blanca (DICM), se sacaron dos bandejas de manera aleatoria desde las jaulas, que contenían 8 plantas cada una y se trataron con 0,1% de imidacloprid a través del riego. Estas bandejas se ubicaron en las estanterías de la cámara climatizada para su posterior evaluación de síntomas. El mismo procedimiento descrito, se realizó a los 10, 15 y 20 DICM.

3.3.2.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate

Una vez establecida la población virulífera de mosca blanca dentro de las jaulas, se procedió a ingresar un conjunto de 64 plantas de 7 variedades tradicionales más la variedad DP, como se describió en el apartado 3.1.2.2. El experimento se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de presión de inóculo (5, 10, 15 y 20 DICM) como se describió en el apartado 3.3.2.1. A partir de los resultados obtenidos en este ensayo, se estableció el tiempo de inoculación más adecuado.

3.3.3 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación con *Bemisia tabaci*

A partir de mosca virulífera obtenida en la descripción del apartado 3.3.2.2, se distribuyeron aleatoriamente dentro de las jaulas, 8 plantas por 8 variedades tradicionales de tomate. En esta ocasión, y a partir de los resultados obtenidos en los puntos anteriores se utilizó un tiempo de inoculación con mosca de 10 DICM para comprobar resultados.

3.3.4 Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV

Con la población de mosca virulífera establecida dentro de las jaulas, se distribuyeron plantas de especies silvestres como se describió en el apartado 3.1.4, cuyo número dependió del porcentaje de germinación de cada entrada. Se utilizó como control positivo plantas de tomate de la variedad DP. El tiempo de inoculación fue similar al del apartado 3.3.3.

3.4 Sistemas de evaluación de la respuesta a la infección por ToLCNDV

3.4.1 Evaluación de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV

Se procedió a la evaluación de los síntomas que presentaban las plantas inoculadas mecánicamente mediante la utilización de un índice de síntomas (IS) (tabla 3.3) (figura 3.6).

Tabla 3.3 Niveles del índice de síntomas (IS) para la evaluación de la sintomatología presentada por las plantas de tomate inoculadas con ToLCNDV.

Niveles (IS)	Características
0	Ausencia de sintomatología
1	Enrollamiento de los folíolos hacia el haz a lo largo del nervio principal en forma de cuchara
2	Enrollamiento, más mosaicos y fruncimiento del haz
3	Marcado mosaico y disminución en el tamaño, nuevos folíolos
4	Los nuevos folíolos ven reducido su tamaño, marcado fruncimiento de haz

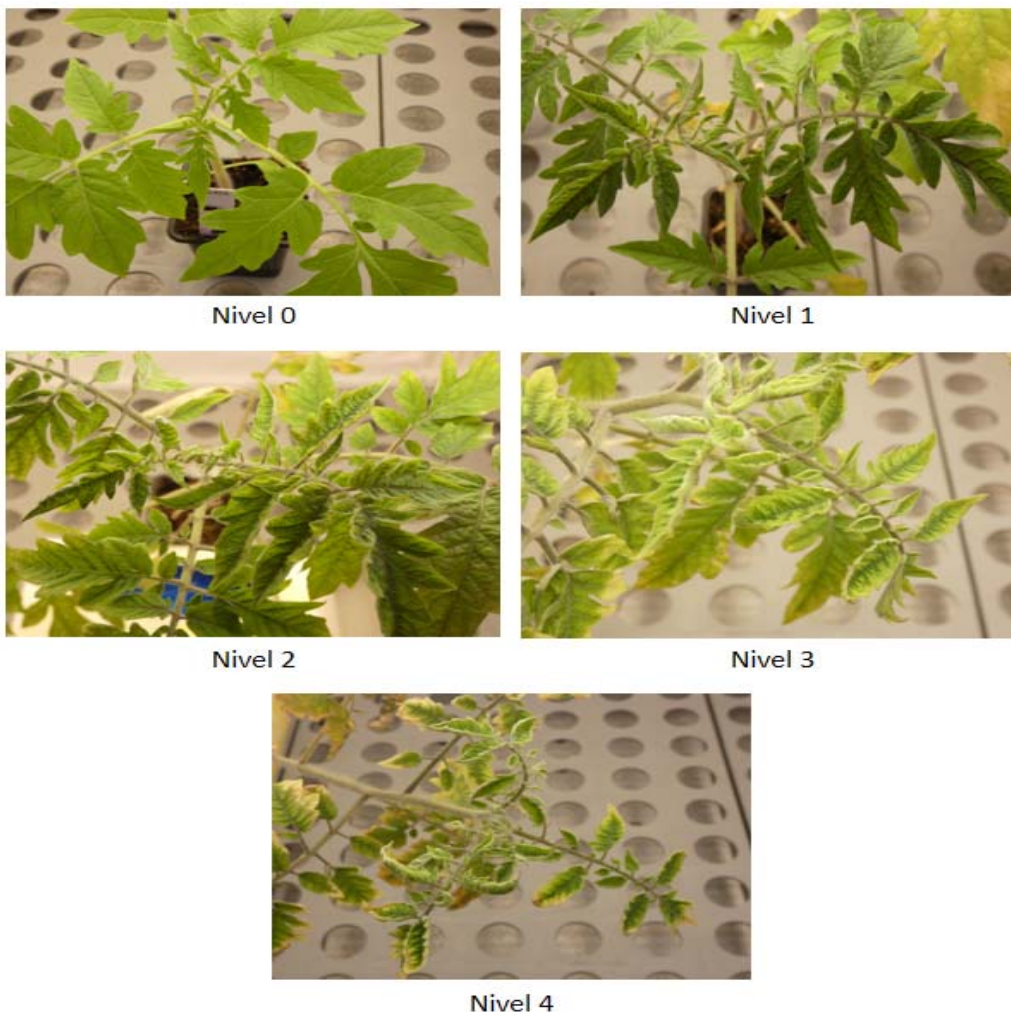


Figura 3.6 Escala de severidad de sintomatología producida por ToLCNDV adaptada.

3.4.2 Evaluación del período de inoculación con mosca blanca para el cribado eficaz de plantas de tomate frente al ToLCNDV

Previa a la evaluación, las bandejas que salieron de las jaulas, fueron tratadas con insecticida como se describió en el apartado 3.3.2.1. Además, se distribuyeron dentro la cámara climatizada trampas cromáticas adhesivas para el control de la mosca blanca (figura 3.7). Se realizaron evaluaciones de severidad de sintomatología según escala sugerida en la tabla 3.3.



Figura 3.7 Evaluación de plantas luego de la inoculación por *Bemisia tabaci* virulífera.

3.4.2.1 Evaluación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal 'De Penjar'

Se utilizó el sistema de evaluación descrito en el apartado 3.4.1. Se consideró como planta infectada aquella que presentaba un índice de síntomas (IS) mayor de 1.

3.4.2.2 Evaluación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate

Se utilizó el sistema de evaluación descrito en el punto 3.4.1.

3.4.3 Evaluación de la eficiencia del método de inoculación con *Bemisia tabaci*

Se utilizó el sistema de evaluación descrito en el punto 3.4.2.1. Además, a los 28 DDI, se tomaron muestras de hoja apical. Estas muestras se analizaron mediante la técnica Triple Antibody Sandwich-Enzyme linked Immunosorbent Assay (TAS-ELISA). Se siguió el protocolo de (Clark and Adams, 1977) con modificaciones, según lo especificado por los proveedores de los anticuerpos (DSMZ) (Anejo 7.2). Se consideró una planta como no infectada por el virus (TAS-ELISA negativa) cuando el análisis de la muestra de hojas apicales dio una absorbancia menor que la absorbancia media de las muestras negativas (plantas no inoculadas) más tres veces su desviación típica. Este umbral en los estudios realizados tuvo un valor de 0,150.

3.4.4 Evaluación de la respuesta de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV

Se utilizó el sistema de evaluación descrito en el apartado anteriormente citado.

3.5 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos en todos los ensayos evaluados a partir de los síntomas, fueron analizados mediante ANOVA al 5% de significación con el software Statgraphics XVII.

Para aquellas variables que presentaron diferencias significativas se realizó la prueba de rango múltiple LSD al mismo nivel de significación.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la aptitud de un sistema de inoculación mecánica para el ToLCNDV

El sistema de inoculación mecánica utilizado para la transmisión del aislado PV-1111 de ToLCNDV, ha sido efectivo sobre plantas de calabacín de la variedad “Verde Mata Compacta” (Figàs *et al.*, 2017). Así, se pudo observar la aparición de síntomas consistentes en mosaicos y deformación de hojas ya a los 7 días después de la inoculación (DDI) (figura 4.1). Sin embargo, no se pudo observar síntoma alguno asociado a la infección por ToLCNDV en ninguna de las 64 plantas de la variedad de tomate DP inoculadas mecánicamente. Estos resultados, aunque utilizando otros tampones de inoculación, ya habían sido descritos por otros autores (Lopez *et al.*, 2015).



Figura 4.1 Síntomas en hoja de planta de calabacín de la variedad Verde Mata Compacta con infección sistémica por ToLCNDV.

4.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal ‘De Penjar’

Si se fue capaz de infectar las plantas de tomate con ToLCNDV utilizando un sistema de inoculación con mosca. Así, a los 7 DDI se observaron síntomas leves en 15 de las 16 plantas inoculadas con mosca durante 5 días (5 DCIM) (IS=0,34) (figura 4.2, tabla 4.1). A los 14 DDI, 15 de las 16 plantas mostraban síntomas de leves a graves. A los 21 días, 15 de las 16 plantas mostraban síntomas moderados a graves. A los 28 DDI, 15 de las 16 plantas mostraron síntomas de moderados a graves, con excepción de una planta que en esta fecha de evaluación presentó síntomas muy leves (figura 4.2, figura 4.3). Es destacable que esta evolución de los síntomas fue diferente con los distintos periodos de inoculación ensayados (5, 10, 15 y 20 días). Así, conforme aumenta el número de días de inoculación con mosca los síntomas aparecieron antes y fueron de mayor intensidad (figura 4.2, tabla 4.2).

El mayor nivel de síntomas observado a los 21 DDI ha sido también obtenido por otros autores utilizando un sistema de agroinoculación (Jyothsna *et al.*, 2013). Parece, por tanto, adecuado en los ensayos de cribado de germoplasma mantener el seguimiento de la enfermedad por lo menos hasta esta duración para una adecuada discriminación o distinción entre materiales susceptibles y supuestamente tolerantes o resistentes.

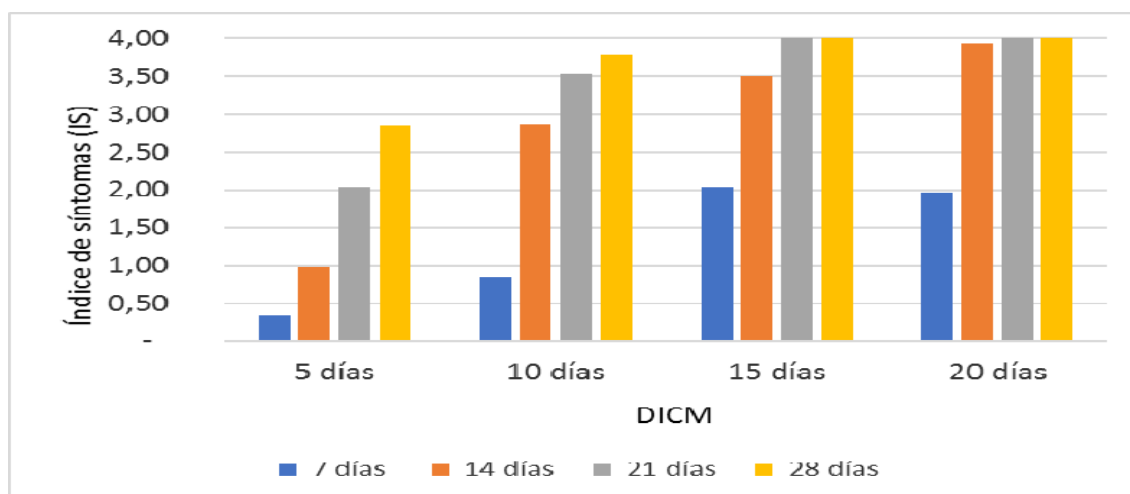


Figura 4.2 Respuesta de la variedad De Penjar al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* con diferentes días de inoculación (DICM). Evaluación temporal de síntomas.

El análisis estadístico de los datos revela que hay un efecto significativo del tiempo de permanencia de las plantas con las moscas sobre la intensidad de los síntomas que muestran (tabla 4.1). Estos resultados nos están indicando que sería necesario mantener las plantas a probar con las moscas infectivas al menos 10 días para distinguir claramente aquellas plantas que muestran infección por ToLCNDV. En cualquier caso, con los 4 periodos de inoculación con mosca se ha obtenido un 100% de plantas con expresión clara de síntomas asociados al ToLCNDV (figura 4.3)

Tabla 4.1 Respuesta de la variedad 'De Penjar' al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* con diferentes días de inoculación (DICM). Evaluación temporal de síntomas.

DICM	Índice de síntomas				ISMM ¹	% PI ²
	Días después de la inoculación (DDI)					
	7 ^a	14 ^b	21 ^{bc}	28 ^c		
5 ^a	0,34	0,97	2,03	2,84	2,84	93,75
10 ^b	0,84	2,88	3,53	3,78	3,88	100
15 ^c	2,03	3,50	4,00	4,00	4,00	100
20 ^c	1,97	3,94	4,00	4,00	4,00	100

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test LSD.

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

El análisis de varianza también mostró que hay diferencias estadísticamente significativas entre las distintas fechas de muestreo (tabla 4.2 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Esto nos indica que, al igual que lo sugerido por otros autores (Jyothsna *et al.*, 2013), es adecuado realizar una evaluación en las cuatro fechas indicadas, lo cual nos permite tener información más detallada sobre la evolución de la planta frente a la inoculación con el virus.

Tabla 4.2 Análisis ANOVA de los factores DICM y DDI para la respuesta de la variedad DP al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci*.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DICM	8,48	3	2,82	18,85	0,0003
B:DDI	13,73	3	4,57	30,50	0,0000
RESIDUOS	1,35	9	0,15		

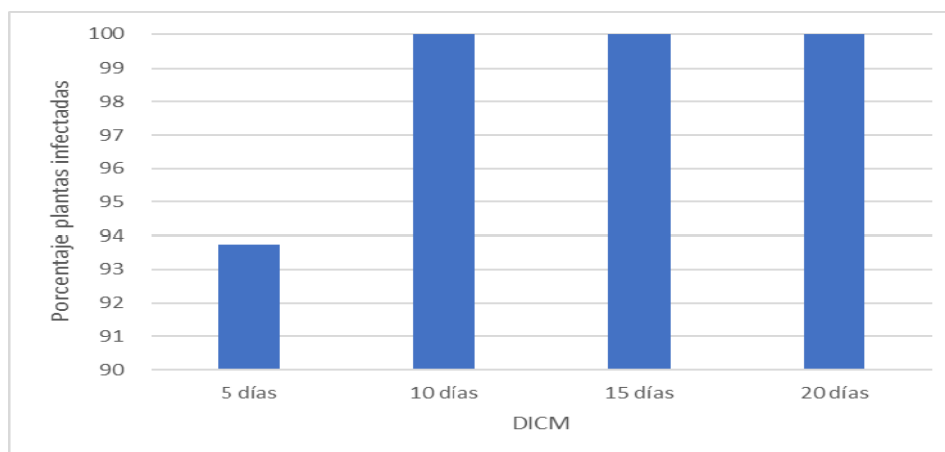


Figura 4.3 Porcentaje de plantas de la variedad De Penjar infectadas con ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* con diferentes días de inoculación (DICM).

Los resultados obtenidos indican que la variedad tradicional de tomate DP evaluada bajo las condiciones señaladas, muestra una elevada susceptibilidad al aislado PV-1111 de ToLCNDV, evidenciándose un comportamiento sostenido en la manifestación acusada de síntomas, por lo que esta entrada podría ser utilizada como un control susceptible para futuros ensayos de evaluación.

4.3 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate

4.3.1 Colección de variedades tradicionales de tomate inoculadas con 5 DICM

La variedad de tomate DP mostró un índice de síntomas medio mayor que el resto de variedades evaluadas en las cuatro fechas destinadas para la toma de síntomas (figura 4.4). Así, a los 7 DDI, la variedad DP tiene un índice de 1,25. A los 14 DDI las plantas de tomate DP mostraron síntomas moderados, que se fueron agravando con el tiempo, y al llegar a los 21 DDI se observó un marcado acucharado y disminución en el tamaño foliar. A los 28 DDI los síntomas se manifestaron graves con un marcado fruncimiento de las hojas. La variedad DP, utilizada como control susceptible, presentó un 100% de plantas con síntomas acusados asociados a la enfermedad causada por ToLCNDV, comportamiento similar al observado en el experimento anterior. Estos resultados indican que las condiciones de inoculación fueron adecuadas.

De forma general, en las 7 variedades tradicionales ensayadas, se produjo un incremento en la severidad de los síntomas conforme avanzaba el desarrollo del experimento. Así, a los 7 DDI, seis de las variedades probadas mostraron síntomas muy leves de la enfermedad causada por el ToLCNDV y una (LJ-4) mostró síntomas leves. A los 14 DDI, dos de las variedades (LJ-4 y SJA-1) mostraron síntomas moderados y en las otras cinco fueron entre moderados y leves. A los 21 DDI, 6 variedades mostraron síntomas entre moderados y graves, y una entre leves y moderados. En cualquier caso, los datos muestran que las siete variedades probadas son susceptibles al ToLCNDV (figura 4.4, tabla 4.3).(figura 4.5).

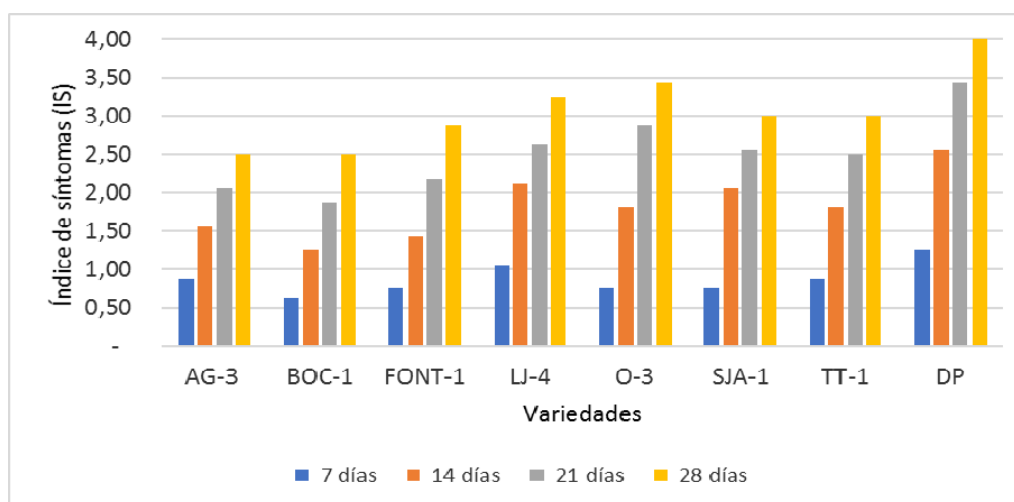


Figura 4.4 Respuesta de 8 variedades tradicionales de tomate mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Tabla 4.3 Respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días. Evaluación temporal de síntomas.

Variedad	Índice de síntomas				ISMM ¹	% PI ²
	Días después de la inoculación (DDI)					
	7 ^a	14 ^b	21 ^c	28 ^d		
AG-3 ^b	0,88	1,56	2,06	2,50	2,50	100
BOC-1 ^a	0,63	1,25	1,88	2,50	2,50	100
FONT-1 ^{bc}	0,75	1,44	2,19	2,88	2,88	100
LJ-4 ^d	1,06	2,13	2,63	3,25	3,25	100
O-3 ^d	0,75	1,81	2,88	3,44	3,44	100
SJA-1 ^{cd}	0,75	2,06	2,56	3,00	3,00	100
TT-1 ^{cd}	0,88	1,81	2,50	3,00	3,00	100
DP ^e	1,25	2,56	3,44	4,00	4,00	100

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test LSD.

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

El análisis de varianza para las variedades tradicionales, evaluadas con 5 DICM, confirma que hay un efecto de la variedad (aun calificándose todas como susceptibles) así como de la fecha de muestreo significativo a nivel estadístico.

Tabla 4.4 Análisis ANOVA de los factores Variedad y DDI para la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV durante 5 días de inoculación con *B. tabaci* (5 DICM).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Variedad	16,29	7	2,32	14,79	0,0000
B:DDI	27,20	3	9,06	57,60	0,0000
RESIDUOS	3,30	21	0,15		

A los 5 DICM, todas las variedades tradicionales de tomate probadas, presentaron un 100% de plantas con síntomas asociados a la infección por ToLCNDV (figura 4.5).

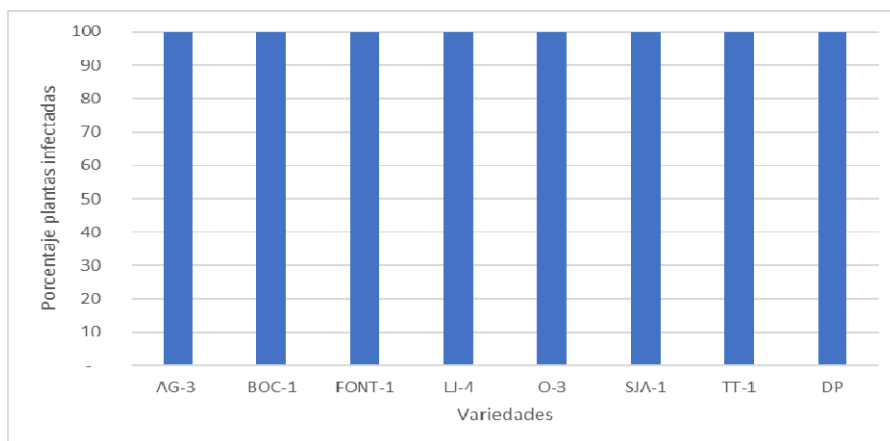


Figura 4.5 Porcentaje de plantas de las variedades tradicionales infectadas con ToLCNDV con 5 días de inoculación con mosca blanca (DICM).

4.3.2 Colección de variedades tradicionales de tomate inoculadas con 10 DICM

La variedad de tomate DP, presentó un 100% de plantas con síntomas asociados a la infección por ToLCNDV, con índices de síntomas medios mayores a 2,50 en todas las fechas de muestreo. A los 7 DDI, las plantas de tomate DP mostraron síntomas moderados de la enfermedad. Estos se fueron agravando con el tiempo, mostrando a los 14 DDI índices medios mayores de 3, que correspondieron a un marcado mosaico y acucharado de los nuevos foliolos. A los 21 DDI los síntomas fueron muy graves (IS=4,0) (figura 4.6) (tabla 4.5). Estos resultados indican, también en este experimento, que las condiciones de inoculación fueron adecuadas.

Con respecto a las 7 variedades tradicionales ensayadas, a los 7 DDI, una variedad (LJ-4) presentó síntomas de moderados a graves de la enfermedad, el resto de las plantas mostraron síntomas de leves a moderados. A los 14 DDI, solo la variedad AG-3 presentó síntomas de leves a moderados, en las otras 6 variedades, los síntomas fueron de moderados a graves. A los 21 DDI, las 7 variedades mostraron síntomas de moderados a muy graves. A los 28 DDI, únicamente la variedad AG-3 mostró síntomas de moderados a graves, las otras seis variedades presentaron síntomas de graves a muy graves (tabla 4.5).

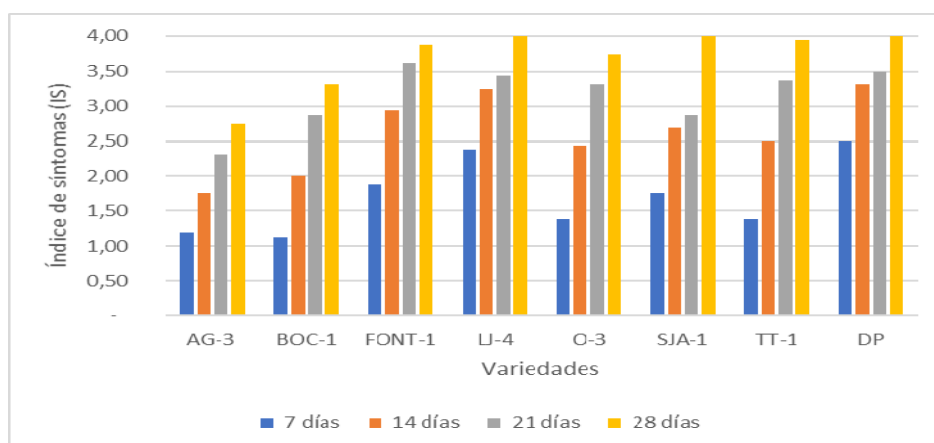


Figura 4.6 Respuesta de 8 variedades tradicionales de tomate mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días. Evaluación temporal de síntomas.

Tabla 4.5 Respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días. Evaluación temporal de síntomas.

Variedad	Índice de síntomas				ISMM ¹	% PI ²
	Días después de la inoculación (DDI)					
	7 ^a	14 ^b	21 ^c	28 ^d		
AG-3 ^a	1,19	1,75	2,31	2,75	2,75	100
BOC-1 ^a	1,13	2,00	2,88	3,31	3,31	100
FONT-1 ^{cd}	1,88	2,94	3,63	3,88	3,88	100
LJ-4 ^e	2,38	3,25	3,44	4,00	4,00	100
O-3 ^b	1,38	2,44	3,31	3,75	3,75	100
SJA-1 ^{bc}	1,75	2,69	2,88	4,00	4,00	100
TT-1 ^{bc}	1,38	2,50	3,38	3,94	3,94	100
DP ^e	2,50	3,31	3,50	4,00	4,00	100

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test LSD.

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Al igual que en el experimento con 5 días de inoculación con mosca, el análisis de varianza para las variedades tradicionales, evaluadas con 10 DICM, muestra que tanto las variedades como las distintas fechas de muestreo presentan diferencias estadísticamente significativas (tabla 4.6).

Tabla 4.6 Análisis ANOVA de los factores Variedad y DDI para la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV durante 10 días de inoculación con *B. tabaci* (10 DICM).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Variedad	3,31	7	0,47	4,95	0,0020
B:DDI	12,93	3	4,31	45,05	0,0000
RESIDUOS	2,00	21	0,09		

A los 10 DICM, todas las variedades tradicionales de tomate probadas presentaron un 100% de plantas con síntomas asociados a la infección por ToLCNDV, manifestado por síntomas muy graves (figura 4.7).

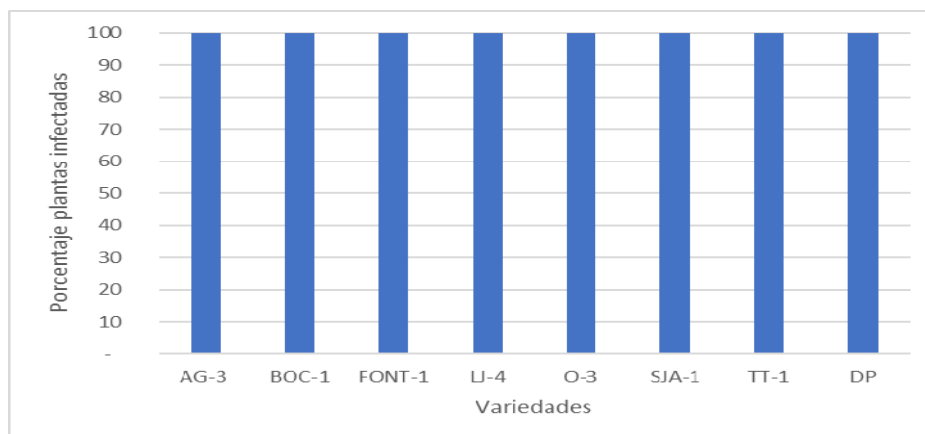


Figura 4.7 Porcentaje de plantas de las variedades tradicionales infectadas con ToLCNDV con 10 días de inoculación con mosca blanca (DICM).

En cualquier caso, utilizando un periodo de inoculación con mosca de 10 días las 7 variedades tradicionales utilizadas mostraron un 100 % de plantas infectadas por ToLCNDV y por tanto un comportamiento susceptible.

4.3.3 Colección de variedades tradicionales de tomate inoculadas con 15 DICM

La variedad de tomate DP, presentó un 100% de plantas con manifestación de síntomas acusados asociados al ToLCNDV. Así, a los 7 DDI las plantas de tomate DP presentaron síntomas entre moderados a graves. Estos se fueron agravando con el tiempo, mostrando a los 14 DDI, índices medios mayores a 3,0 que correspondieron a síntomas graves, que se manifestaron con marcados mosaicos. A los 21 DDI y 28 DDI los síntomas fueron muy graves ($IS > 3,50$) (figura 4.8) (tabla 4.7). Estos resultados al igual que en los puntos 4.3.1 y 4.3.2, indican que las condiciones de inoculación fueron adecuadas.

A los 7 DDI, las siete variedades evaluadas mostraron síntomas de leves a graves. A los 14 DDI, las siete variedades presentaron síntomas entre moderados y graves. A los 21 DDI, los síntomas para las siete variedades fueron entre graves y muy graves y al llegar a los 28 DDI, todas las variedades evaluadas mostraron síntomas muy graves (Figura 4.8, Tabla 4.7). Estos resultados confirman los obtenidos en el experimento 4.2 en que los síntomas aparecieron antes y evolucionaron de forma más rápida y hasta niveles mayores cuando las plantas permanecieron un mayor número de días con las moscas.

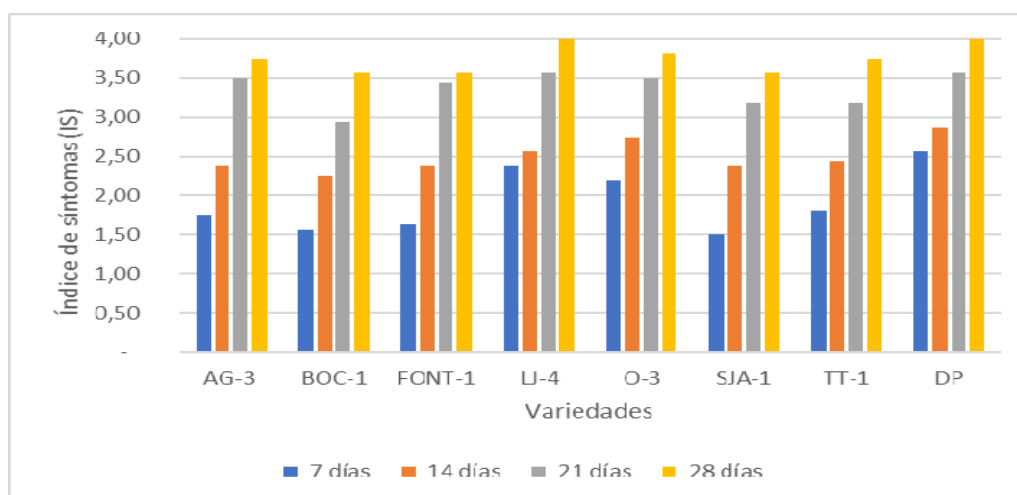


Figura 4.8 Respuesta de 8 variedades tradicionales de tomate mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días. Evaluación temporal de síntomas.

Tabla 4.7 Respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días. Evaluación temporal de síntomas.

Varietad	Índice de síntomas				ISMM ¹	% PI ²
	Días después de la inoculación (DDI)					
	7 ^a	14 ^b	21 ^c	28 ^d		
AG-3 ^{bc}	1,75	2,38	3,50	3,75	3,75	100,00
BOC-1 ^a	1,56	2,25	2,94	3,56	3,56	100,00
FONT-1 ^{ab}	1,63	2,38	3,44	3,56	3,56	100,00
LJ-4 ^e	2,38	2,56	3,56	4,00	4,00	100,00
O-3 ^{cd}	2,19	2,75	3,50	3,81	3,81	100,00
SJA-1 ^{ab}	1,50	2,38	3,19	3,56	3,56	100,00
TT-1 ^b	1,81	2,44	3,19	3,75	3,75	100,00
DP ^e	2,56	2,88	3,56	4,00	4,00	100,00

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test LSD.

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

El análisis de varianza para las variedades tradicionales, evaluadas con 15 DICM, muestra que tanto el factor variedad como el factor días después de la inoculación (DDI) presentan diferencias estadísticamente significativas (tabla 4.8).

Tabla 4.8 Análisis ANOVA de los factores Variedad y DDI para la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV durante 15 días de inoculación con *B. tabaci* (15 DICM).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Variedad	1,58	7	0,22	10,32	0,0000
B:DDI	16,35	3	5,45	248,97	0,0000
RESIDUOS	0,45	21	0,02		

A los 15 DICM, todas las variedades tradicionales de tomate presentaron un 100% de plantas con infección por ToLCNDV (tabla 4.9).

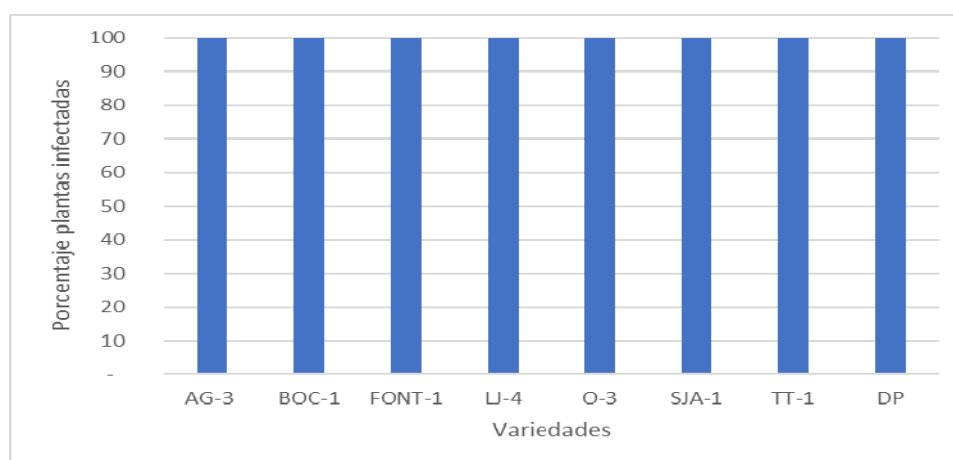


Figura 4.9 Porcentaje de plantas de las variedades tradicionales infectadas con ToLCNDV con 15 días de inoculación con mosca blanca (DICM).

4.3.4 Colección de variedades tradicionales de tomate con 20 DICM

La variedad de tomate DP, presentó un comportamiento susceptible al igual que en los experimentos realizados con anterioridad (tabla 4.9). Esto nos confirma una vez más la utilidad de esta variedad como control susceptible, así como que las condiciones de inoculación han sido también adecuadas en este experimento.

A los 7 DDI, las siete variedades tradicionales probadas mostraron síntomas de moderados a graves. A los 14 DDI, estas siete variedades mostraron síntomas graves a graves, excepto O-3 que mostró síntomas de moderados a graves. A los 21 DDI las siete variedades presentaron síntomas de graves a muy graves. Al llegar a los 28 DDI, los síntomas en las siete variedades fueron muy graves (figura 4.10, tabla 4.9).

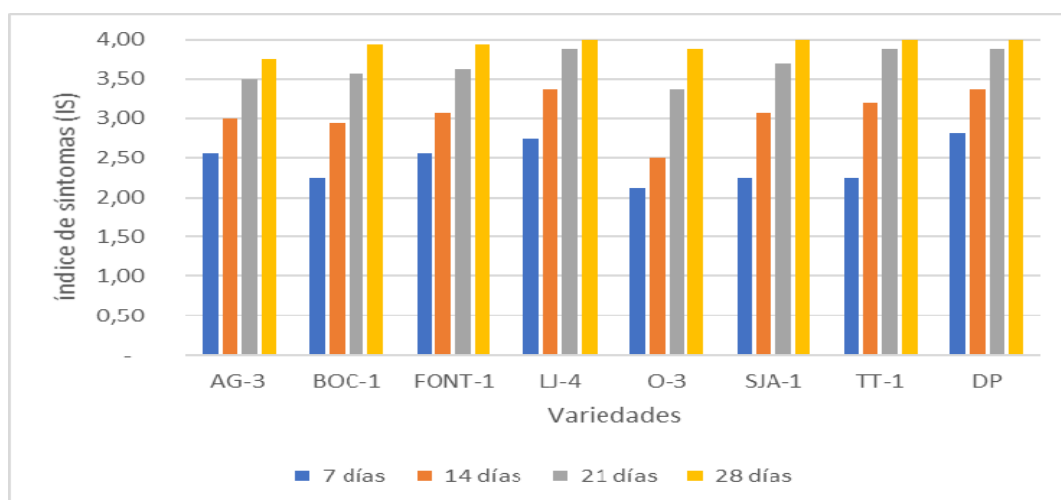


Figura 4.10 Respuesta de 8 variedades tradicionales de tomate mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días. Evaluación temporal de síntomas.

Tabla 4.9 Respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días. Evaluación temporal de síntomas.

Variedad	Índice de síntomas				ISMM ¹	% PI ²
	Días después de la inoculación (DDI)					
	7 ^a	14 ^b	21 ^c	28 ^d		
AG-3 ^b	2,56	3,00	3,50	3,75	3,75	100,00
BOC-1 ^{ab}	2,25	2,94	3,56	3,94	3,94	100,00
FONT-1 ^{bc}	2,56	3,06	3,63	3,94	3,94	100,00
LJ-4 ^{cd}	2,75	3,38	3,88	4,00	4,00	100,00
O-3 ^a	2,13	2,50	3,38	3,88	3,88	100,00
SJA-1 ^b	2,25	3,06	3,69	4,00	4,00	100,00
TT-1 ^{bcd}	2,25	3,19	3,88	4,00	4,00	100,00
DP ^e	2,81	3,38	3,88	4,00	4,00	100,00

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test LSD.

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

El análisis de varianza para las variedades evaluadas con 20 DICM, muestra que tanto el factor variedad como el factor días después de la inoculación (DDI) presentan diferencias estadísticamente significativas (tabla 4.10).

Tabla 4.10 Análisis ANOVA de los factores Variedad y DDI para la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV durante 20 días de inoculación con *B. tabaci*.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Variedad	0,88	7	0,12	5,97	0,0006
B:DDI	10,67	3	3,55	167,67	0,0000
RESIDUOS	0,44	21	0,02		

A los 20 DICM, todas las variedades presentaron un 100% de plantas con síntomas asociados al ToLCNDV (figura 4.11).

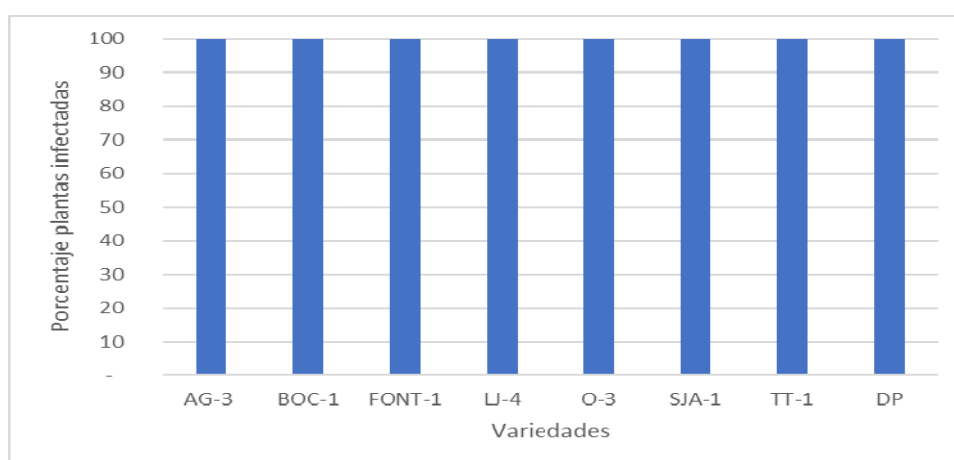


Figura 4.11 Porcentaje de plantas de las variedades tradicionales infectadas con ToLCNDV con 20 días de inoculación con mosca blanca (DICM).

4.3.5 Evaluación de los tres factores relacionados con la inoculación de una colección de variedades tradicionales de tomate con *B. tabaci*

El análisis de varianza para estudiar el efecto de la variedad, el tiempo de inoculación y la fecha de muestreo en la respuesta a la infección por ToLCNDV, mostró que en los tres casos se presentaron diferencias estadísticamente significativas (tabla 4.11).

Tabla 4.11 Análisis de varianza para los factores variedad, días de inoculación con mosca (DICM) y días después de la inoculación (DDI) relacionadas con la inoculación de una colección tradicional de plantas de tomate con *B. tabaci*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Variedad	8,58	7	1,22	15,08	0,0000
B:DICM	24,72	3	8,24	101,31	0,0000
C:DDI	62,87	3	20,95	257,69	0,0000
RESIDUOS	9,27	114	0,081		

Las plantas de la variedad de tomate DP, muestran diferencias estadísticamente significativas con el resto de las variedades de la colección evaluada. Es decir que esta variedad es más susceptible al ToLCNDV que las demás y se confirma la utilidad de esta variedad como control susceptible en los cribados de germoplasma para la búsqueda de fuentes de resistencia al ToLCNDV (tabla 4.12).

Tabla 4.12 Prueba de rangos múltiples para índice de síntomas por variedad.

Variedad	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
BOC-1	16	2,41	0,071	X
AG-3	16	2,44	0,071	X
SJA-1	16	2,70	0,071	X
FONT-1	16	2,73	0,071	X
O-3	16	2,74	0,071	X
TT-1	16	2,90	0,071	XX
LJ-4	16	3,04	0,071	XX
DP	16	3,22	0,071	X

Al evaluar los días de inoculación con mosca, se observa que para los 10 y 15 DICM no hay diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, sí que hay diferencias significativas entre 5, 10-15 y 20 DICM. Como ya se ha discutido anteriormente cuando las plantas permanecen más tiempo con las moscas virulíferas, los síntomas aparecen antes y son más altos en las últimas fechas de evaluación (Jyothsna *et al.*, 2013).

Tabla 4.13 Prueba de rangos múltiples para índice de síntomas por DICM.

DICM	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5	32	2,07	0,050	X
10	32	2,87	0,050	X
15	32	2,88	0,050	X
20	32	3,28	0,050	X

La evaluación de las fechas en las cuales se tomaron los síntomas, indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre las mismas. Esto sugiere que se debe tomar los síntomas en las cuatro fechas señaladas (tabla 4.14). Esto nos permitirá, durante la realización de ensayos de búsqueda de fuentes de resistencia al ToLCNDV, realizar una discriminación más adecuada entre materiales susceptibles, tolerantes o con resistencia total al virus.

Tabla 4.14 Prueba de rangos múltiples para índice de síntomas por DDI.

DDI	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	32	1,76	0,050	X
14	32	2,52	0,050	X
21	32	3,19	0,050	X
28	32	3,61	0,050	X

4.4 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación con *Bemisia tabaci* con 10 DCIM.

El análisis de los resultados obtenidos hasta el momento ha indicado la existencia de diferencias estadísticamente significativas a nivel de sintomatología entre las variedades tradicionales de tomate probadas y entre los períodos de tiempo que las plantas permanecen en contacto con las moscas, así como entre las fechas en las cuales se toman los síntomas después de la inoculación. Así, se ha constatado que con un tiempo de inoculación con mosca de 10 días (10 DICM), tanto en la variedad DP, como las otras 7 variedades tradicionales probadas (figura 4.13) se consigue obtener un 100 % de plantas con síntomas graves asociados al ToLCNDV (punto 4.2). Por lo que, para la realización de cribados de germoplasma en la búsqueda de fuentes de resistencia a este virus, sería suficiente con 10 días de inoculación con mosca. Para comprobar, la eficacia de este tiempo de permanencia de las plantas con *B. tabaci*, se volvió a utilizar este tiempo de inoculación. La permanencia de las plantas de la colección de variedades tradicionales con la población infectiva de *B. tabaci*, citada anteriormente, durante 10 días permitió corroborar los resultados obtenidos previamente. Así, la variedad de tomate DP mostró un 100 % de plantas con síntomas asociados al ToLCNDV ya a los 7 DDI. La respuesta de esta variedad fue similar a la observada en los ensayos anteriores y

por tanto se comprobó la eficacia de utilizar un tiempo de inoculación con mosca de 10 días. Así mismo, se comprobó la utilidad de la variedad DP como control susceptible (tabla 4.15).

A los 7 DDI, la variedad LJ-4 presentó síntomas de leves a moderados de la enfermedad, las otras seis variedades presentaron síntomas de muy leves a leves. A los 14 DDI, las variedades AG-3, FONT-1, LJ-4, O-3, SJA-1 y TT-1 muestran síntomas de moderados a graves, mientras que BOC-1 presentó síntomas de leves a moderados. A los 21 DDI, las siete variedades evaluadas presentaron síntomas de moderados a graves. A los 28 DDI, las siete variedades evaluadas presentan síntomas muy graves (figura 4.12, Tabla 4.15). Los resultados corroboran el comportamiento susceptible de las 7 variedades tradicionales descrito anteriormente y teniendo en cuenta el comportamiento susceptible obtenido en los experimentos anteriores, se comprueba también la eficacia del tratamiento de inoculación con mosca durante 10 días.

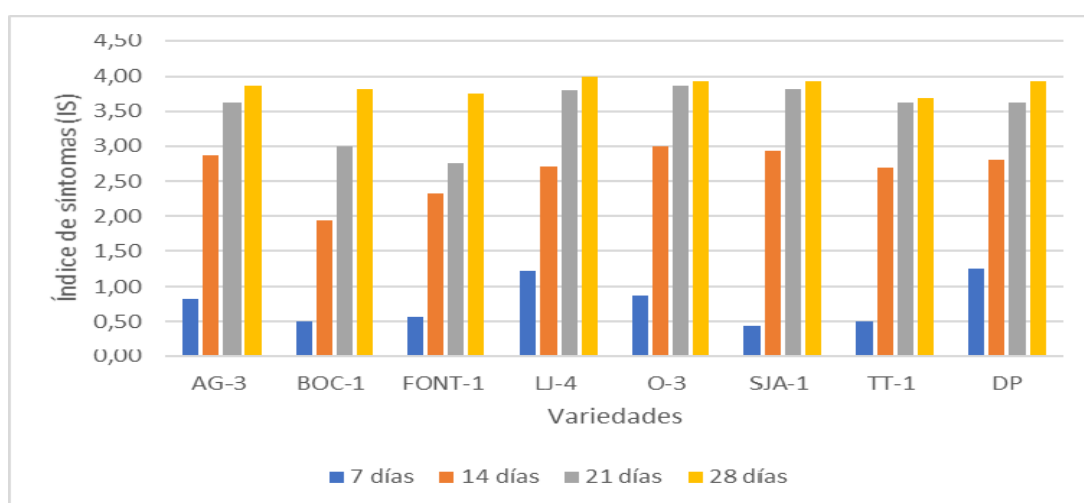


Figura 4.12 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación en 8 variedades tradicionales de tomate mediante *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Tabla 4.15 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación en la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Variedad	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7 ^a	14 ^b	21 ^c	28 ^d			Media ³	
AG-3 ^b	0,81	2,88	3,63	3,88	3,88	100	0,29	75,00
BOC-1 ^a	0,50	1,94	3,00	3,81	3,81	100	0,32	87,50
FONT-1 ^a	0,56	2,31	2,75	3,75	3,75	100	0,23	37,50
LJ-4 ^b	1,21	2,71	3,79	4,00	4,00	100	0,36	42,86
O-3 ^b	0,88	3,00	3,88	3,94	3,94	100	0,36	75,00
SJA-1 ^b	0,44	2,94	3,81	3,94	3,94	100	0,34	87,50
TT-1 ^{ab}	0,50	2,69	3,63	3,69	3,88	100	0,29	62,50
DP ^b	1,25	2,81	3,63	3,94	4,00	100	0,37	62,50

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test LSD para el ISMM.

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

3: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

El análisis de varianza muestra de nuevo que tanto las variedades como las distintas fechas de muestreo presentan diferencias estadísticamente significativas (tabla 4.16). Se ha comprobado la elevada susceptibilidad tanto del control DP como de las demás 7 variedades tradicionales utilizando 10 días de inoculación con mosca. Los resultados, por tanto, nos indican que esta duración de inoculación es suficiente para alcanzar porcentajes de plantas afectadas por el virus del 100 % y no hace falta ir a tiempos de inoculación mayores en cribados de germoplasma.

Tabla 4.16 Análisis ANOVA de los factores Variedad y DDI para la comprobación de la eficiencia del método de inoculación en la respuesta de las variedades tradicionales de tomate al ToLCNDV durante 10 días de inoculación con *B. tabaci*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Variedades	1,78	7	0,25	4,72	0,0026
B:DDI	46,09	3	15,36	284,96	0,0000
RESIDUOS	1,13	21	0,05		

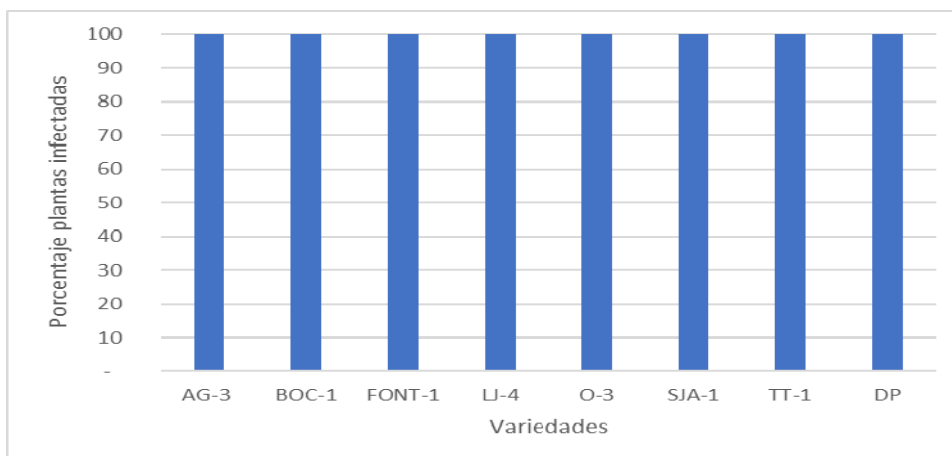


Figura 4.13 Respuesta de una colección de 7 variedades tradicionales de tomate frente a la inoculación con *B. tabaci* 10 DICM.

El porcentaje de plantas infectadas en base al estudio serológico TAS-ELISA fue variable dentro de la colección. Así, la variedad de tomate DP aunque mostró un 100% de plantas con síntomas típicos de ToLCNDV, presentó un 62,5% de plantas positivas al TAS-ELISA (figura 4.14). También las variedades BOC-1 y SJA-1 mostraron los mayores porcentajes de plantas TAS-ELISA positivas (figura 4.14). Sin embargo, estas dos variedades no presentaron los mayores niveles de acumulación viral (figura 4.15). Estos resultados pueden ser debidos a la peculiar distribución del *begomovirus* ToLCNDV en las plantas infectadas (Sayed *et al.*, 2013). Así, posiblemente debido a un efecto del muestreo de las plantas durante la realización del análisis TAS-ELISA, se detectaron diferencias en el porcentaje de plantas infectadas con el virus, así como en los niveles de acumulación, aunque finamente todas las variedades presentaron un 100% de plantas con síntomas asociados al virus.

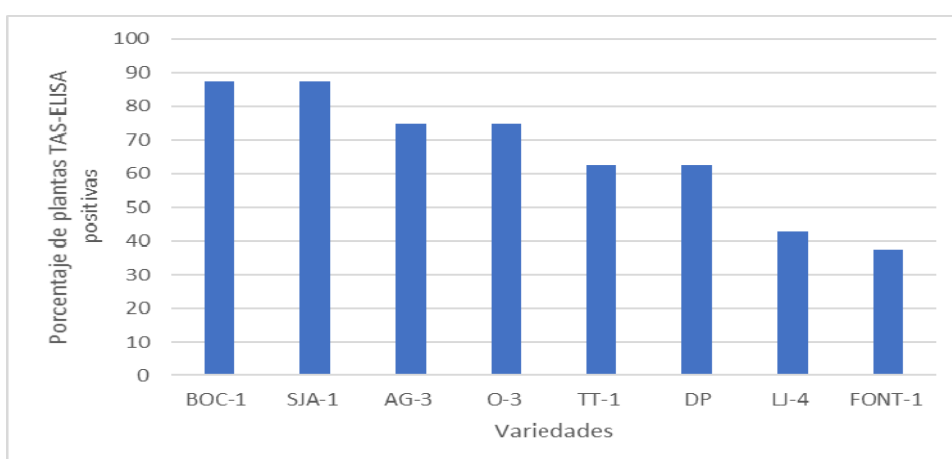


Figura 4.14 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación en el porcentaje de plantas infectadas de las variedades tradicionales con ToLCNDV con 10 días de inoculación con mosca blanca, en atención a TAS-ELISA.

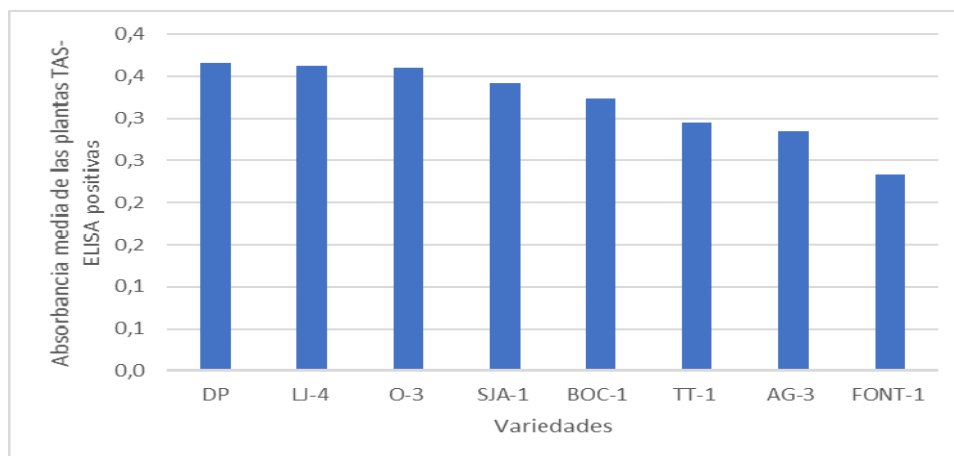


Figura 4.15 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación en la respuesta de 8 variedades tradicionales de tomate mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM), en atención a TAS-ELISA. Evaluación a los 28 DDI.

En cualquier caso, la técnica TAS-ELISA puede ser de adecuada de forma combinada con la observación de síntomas para la caracterización o cribado de germoplasma frente a la infección por ToLCNDV.

4.5 Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos descritos anteriormente y sobre la observación que el tiempo de permanencia de las plantas con la población infectiva de *B. tabaci*, es de 10 días, se procedió a someter a esta presión de inóculo a una colección de entradas silvestres emparentadas con el tomate referenciada en el punto 3.1.4 de materiales y métodos.

La variedad de tomate DP mostró a los 7 DDI, síntomas leves de la enfermedad. A los 14 DDI, los síntomas pasaron a ser moderados a graves. A los 21 y 28 DDI, los síntomas se manifestaron como muy graves en todas las plantas evaluadas (figura 4.16). Estos resultados, como se ha indicado anteriormente, indican que las condiciones de inoculación en este experimento fueron adecuadas.

El análisis de varianza para las especies silvestres analizadas confirma que hay un efecto significativo a nivel estadístico entre las distintas entradas evaluadas y los días después de la inoculación (DDI).

A los 7 DDI, las 18 entradas evaluadas mostraron síntomas muy leves de la enfermedad, al llegar a los 14 DDI, 15 entradas presentaron síntomas muy leves, mientras que LA1317 de *S. chmielewskii*, LA1322 de *S. neorickii* y LA1982 de *S. huaylasense* mostraron síntomas de leves a moderados. Al llegar a los 21 DDI, únicamente 7 entradas mostraron síntomas muy leves y las 11 entradas restantes, presentaron síntomas de leves a muy graves. A los 28 DDI, las entradas que presentaron síntomas graves a muy graves fueron LA1223 de *S. habrochaites*, LA1317 de *S. chmielewskii* y LA1322 de *S. neorickii*, las otras 15 entradas mostraron síntomas de leves a moderados (figura 4.16, tabla 4.17).

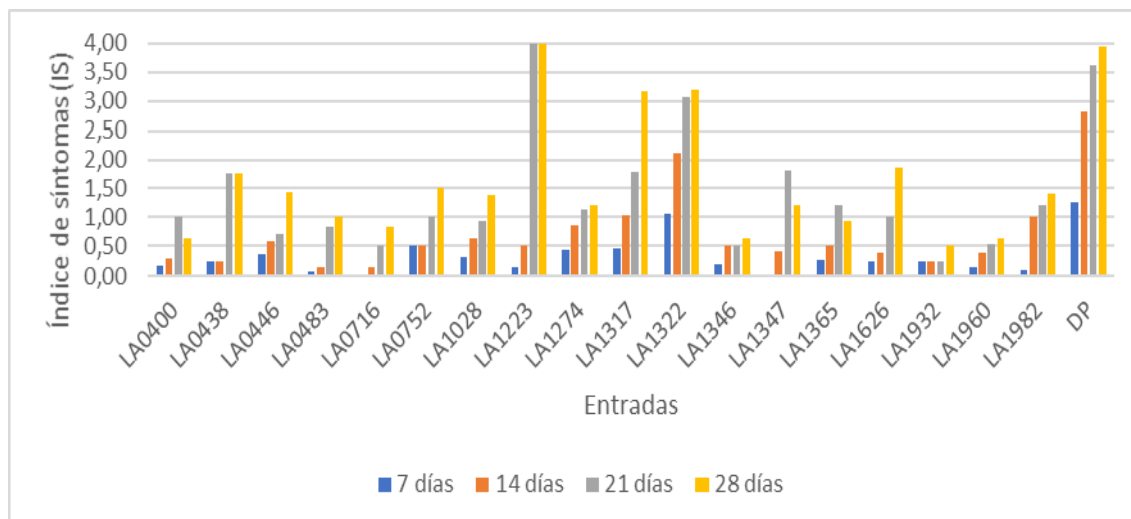


Figura 4.16 Respuesta de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días. Evaluación temporal de síntomas.

Se observó variabilidad en el comportamiento de las distintas entradas evaluadas. Así, se evidenciaron tres grupos de entradas diferenciados por el porcentaje de plantas infectadas, el primer grupo formado por entradas que presentaron el 100% de plantas infectadas (IS>1), un segundo grupo constituido por el rango del 20% al 80% de plantas infectadas, el tercer grupo formado por entradas con menos del 20% de plantas infectadas.

Así, en el primer grupo, se encontraron 7 entradas que presentaron el 100% de plantas infectadas (LA0446 y LA0752 de *S. peruvianum*; LA0483 de *S. galapagense* y LA1028 de *S. chmielewskii*) que mostraron síntomas de leves a moderados, mientras que las entradas (LA1223 de *S. habrochaites*, LA1317 de *S. chmielewskii* y LA1322 de *S. neorickii*) mostraron síntomas asociados a la infección por ToLCNDV que van desde graves a muy graves (figura 4.17, Tabla 4.17).

En el segundo grupo, se encontraron 10 entradas que contenían entre el 20% al 80% de plantas infectadas, siendo las entradas (LA0716 de *S. pennellii*, LA1346 de *S. arcanum* y LA1960 de *S. chilense*) síntomas muy leves, mientras que las entradas (LA0400 de *S. pimpinellifolium*, LA0438 de *S. galapagense*, LA1274 de *S. corneliomulleri*, LA1347 de *S. habrochaites*, LA1365 de *S. huaylasense*, LA1626 de *S. arcanum*, LA1982 de *S. huaylasense*) mostraron síntomas de leves a moderados (figura 4.17, Tabla 4.17).

El tercer grupo con menos del 20% de plantas infectadas, está formado por una entrada, LA1932 de *S. chilense*, que mostró plantas asintomáticas (figura 4.17, Tabla 4.17).

Tabla 4.17 Respuesta de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días. Evaluación temporal de síntomas.

Entrada	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7 ^a	14 ^b	21 ^c	28 ^c			Media ³	
LA0400 ^a	0,19	0,31	1,00	0,63	1,06	25,00	0,39	100,00
LA0438 ^{ab}	0,25	0,25	1,75	1,75	1,75	50,00	0,71	100,00
LA0446 ^a	0,36	0,57	0,71	1,43	1,43	100,00	0,38	100,00
LA0483 ^a	0,08	0,17	0,83	1,00	1,00	100,00	0,52	100,00
LA0716 ^a	0,00	0,17	0,50	0,83	0,83	66,67	0,25	100,00
LA0752 ^{ab}	0,50	0,50	1,00	1,50	1,50	100,00	0,36	100,00
LA1028 ^a	0,32	0,64	0,93	1,38	1,38	100,00	0,21	100,00
LA1223 ^{cd}	0,17	0,50	4,00	4,00	4,00	100,00	0,00	0,00
LA1274 ^{ab}	0,43	0,86	1,14	1,21	1,36	71,43	0,23	28,57
LA1317 ^{bc}	0,46	1,04	1,79	3,17	3,17	100,00	0,33	25,00
LA1322 ^{cd}	1,06	2,13	3,06	3,19	3,69	100,00	0,36	87,50
LA1346 ^a	0,21	0,50	0,50	0,63	0,63	25,00	0,18	16,67
LA1347 ^a	0,00	0,40	1,80	1,20	1,19	20,00	0,34	100,00
LA1365 ^a	0,29	0,50	1,21	0,93	1,43	42,86	0,55	100,00
LA1626 ^{ab}	0,25	0,38	1,00	1,88	1,88	75,00	0,11	75,00
LA1932 ^a	0,25	0,25	0,25	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00
LA1960 ^a	0,14	0,39	0,54	0,64	0,68	21,43	0,00	14,29
LA1982 ^{ab}	0,10	1,00	1,20	1,40	1,50	80,00	0,21	100,00
DP ^d	1,25	2,81	3,63	3,94	4,00	100,00	0,26	62,50

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test LSD.

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

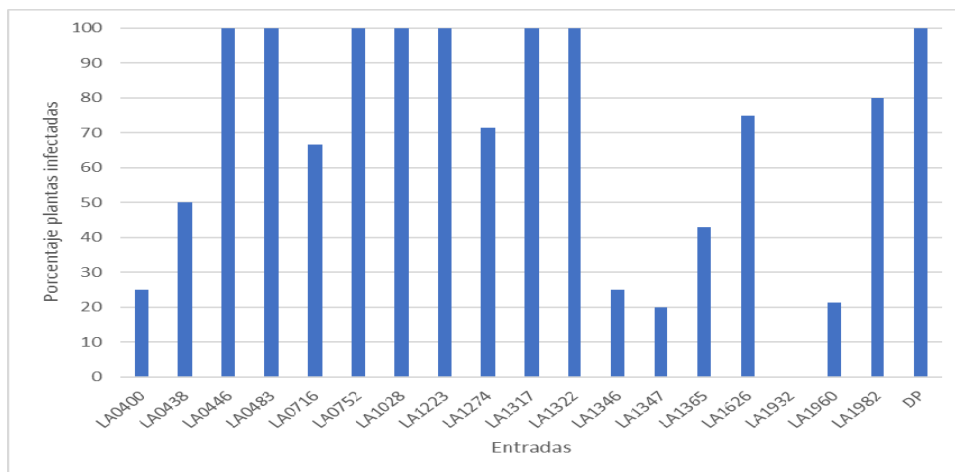


Figura 4.17 Porcentaje de plantas infectadas de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días.

En cuanto a los resultados del análisis TAS-ELISA, cabe resaltar el comportamiento de las siguientes entradas que presentaron valores de absorbancia máxima media igual a cero (figura 4.19). Así, las entradas LA1932 y LA1960 de *S. chilense* presentaron síntomas muy leves, mientras que la entrada LA1223 de *S. habrochaites*, mostró síntomas muy graves (tabla 4.17, figura 4.18). La baja acumulación viral en las entradas de *S. chilense* pudiera ser prometedora para el desarrollo de variedades tolerantes al ToLCNDV.

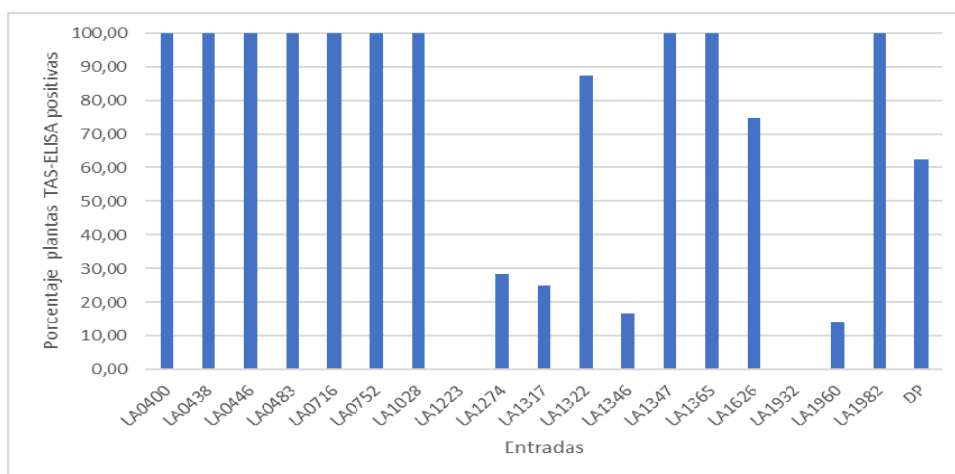


Figura 4.18 Porcentaje de plantas infectadas de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate infectadas con ToLCNDV con 10 días de inoculación con mosca blanca en atención a TAS-ELISA.

Como ya ha sido indicado, el porcentaje de plantas con síntomas asociados a la infección por ToLCNDV fue variable en la colección evaluada, salvo en la entrada LA1932, en la cual ninguna de las plantas probadas mostró síntomas de la enfermedad (tabla 4.17). Así mismo, el análisis TAS-ELISA de estas plantas indicó la ausencia del virus en las mismas. Estos resultados indican que esta entrada podría ser prometedora para el desarrollo de variedades de tomate resistentes al ToLCNDV. Así, en otros trabajos de investigación que buscan fuentes de resistencia a virosis (Picó *et al.*, 1999; Foolad, 2007; Soler-Aleixandre *et al.*, 2007), la especie *S. chilense* se ha mostrado muy útil en la identificación de ciertos niveles de resistencia a distintas enfermedades de etiología viral.

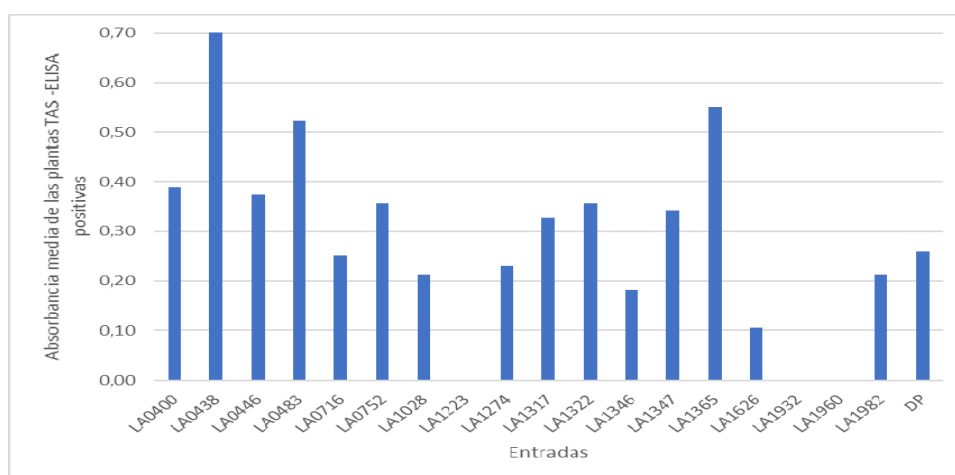


Figura 4.19 Respuesta de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días, en atención a TAS-ELISA. Evaluación a los 28 DDI.

5 CONCLUSIONES

- El sistema de inoculación mecánica utilizado para la transmisión del ToLCNDV en cucurbitáceas no ha sido efectivo para la transmisión del aislado PV-1111 de este virus sobre plantas de tomate.
- La utilización de una población de *B. tabaci* virulífera se ha mostrado como un sistema de inoculación eficaz en la infección de plantas de tomate con ToLCNDV.
- La variedad de tomate del tipo varietal 'De Penjar' (DP) presentó un 100% de plantas con expresión de síntomas asociados a la enfermedad causada por el ToLCNDV. Es decir, muestra un comportamiento susceptible frente a la inoculación de ToLCNDV y por lo tanto parece ser una buena candidata a ser utilizada como control susceptible.
- Este comportamiento susceptible se mantuvo con distintos tiempos de inoculación con *B. tabaci* (5, 10, 15 y 20 días de inoculación con mosca (DICM)). En atención a los análisis estadísticos se sugiere como tiempo de inoculación mínimo los 10 DCIM. Así mismo, se sugiere mantener una evaluación de síntomas a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación para discriminar de forma adecuada entre materiales susceptibles, tolerantes o resistentes totales.
- Se ha comprobado que es suficiente un tiempo de inoculación con mosca de 10 días para conseguir un 100% de infección en la variedad DP utilizada como control susceptible. Esto mismo ha sido comprobado en un conjunto de 7 variedades tradicionales valencianas de distintos tipos varietales que han resultado ser susceptibles a la enfermedad causada por el ToLCNDV.
- Las entradas LA1028, LA0483, LA0446, LA0752, LA1223, LA1317, y LA1322 fueron clasificadas como susceptibles frente a la inoculación con mosca blanca infectiva. Es decir, presentaron un 100% de plantas con síntomas claros de la enfermedad asociados a la infección por ToLCNDV y elevadas acumulaciones virales en la mayoría de los casos.
- Los resultados obtenidos confirman la especie *S. chilense* como la más prometedora para la búsqueda de resistencia frente al ToLCNDV. Sería necesario comprobar si las entradas de *S. chilense* caracterizadas como tolerantes, expresan este comportamiento tolerante debido a la presencia de sistemas genéticos que confieren resistencia a otros *begomovirus* como el TYLCV.

6 BIBLIOGRAFÍA

Clark, M. F.; Adams, A. N. (1977) 'Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses', *J. Gen. Virol.*, 34, pp. 475–483.

Conti, M.; Gallitelli, D.; Lisa, V. Lovisolo, O.; Martelli, G.P.; Ragozzino, A. (2001) 'Principales virus de las plantas hortícolas'. Madrid: Mundi-Prensa.

FAO (2017), FAO statistical yearbook. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, Italy. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>.

Figàs, M. R.; Alfaro-Fernández, A.; Font, M. I.; Borràs, D.; Casanova, C.; Hurtado, M.; Plazas, M.; Prohens, J.; Soler, S. (2017) 'Inoculation of cucumber, melon and zucchini varieties with Tomato leaf curl New Delhi virus and evaluation of infection using different detection methods', *Annals of Applied Biology*, 170(3), pp. 405–414.

Fondong, V. N. (2013) 'Geminivirus protein structure and function', *Molecular Plant Pathology*, 14(6), pp. 635–649.

Font, I. (2016) 'Virosis en hortícolas', Jornada técnica Agroalimentaria en Almería, p. 45.

Font, M. I. (2003) 'Tomato yellow leaf curl virus en los cultivos españoles: Variabilidad y caracterización de los aislados'. *Universidad Politécnica de Valencia*.

Foolad, M. R. (2007) 'Genome mapping and molecular breeding of tomato', *International Journal of Plant Genomics*.

Fortes, I. M.; Sánchez-Campos, S.; Fiallo-Olivé, E.; Díaz-Pendón, J.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E. (2016) 'A Novel strain of tomato leaf curl New Delhi virus has spread to the Mediterranean Basin'. *Viruses*, 8(11), pp. 307.

García-Andrés, S.; Monci, F.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E. (2006) 'Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature', *Virology*, 350, pp. 433–442.

Grzebelus, D.; Baranski, R.; Spalik, K.; Allender, C.; Simon, P. (2015) 'Daucus', *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Vegetables*, USA:Springer, pp. 91-114

Hanley-Bowdoin, L.; Bejarano, E. R.; Robertson, D.; Mansoor, S. (2013) 'Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes', *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), pp. 777–788.

Juarez, M.; Gosalvez, B.; Hernando, Y.; Aranda, M. (2014) 'Virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV): Un nuevo virus que afecta gravemente cucurbitáceas en Almería y Murcia', pp. 1–10.

Jyothsna, P.; Haq, Q. M. I.; Singh, P., Sumiya, K. V.; Praveen, S.; Rawat, R.; Briddon, R. W.; Malathi, V. G. (2013) 'Infection of tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), a bipartite begomovirus with betasatellites, results in enhanced level of helper virus components and antagonistic interaction between DNA B and betasatellites', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), pp. 5457–5471.

Landeira, M. (2016) 'Detección e identificación de Begomovirus en España. Variabilidad genética de aislados de ToLCNDV de la Comunidad Valenciana'. *Universitat Politècnica de València*.

Leke, W. N.; Mignouna, D. B., Brown, J. K.; Kvarnheden, A. (2015) 'Begomovirus disease

complex: emerging threat to vegetable production systems of West and Central Africa', *Agriculture & Food Security*, 4(1), pp. 1.

Lopez, C., Ferriol, M.; Picó, M. B. (2015) 'Mechanical transmission of tomato leaf curl New Delhi virus to cucurbit germplasm: selection of tolerance sources in *Cucumis melo*', pp. 679–691.

Malathi, V. G.; Renukadevi, P.; Chakraborty, S.; Biswas, K. K.; Roy, A.; Sivalingam, P. N.; Venkataravanappa, V.; Mandal, B. (2017) 'Begomoviruses and their satellites occurring in India: Distribution, diversity and pathogenesis', *A Century of Plant Virology in India*.

MAPAMA (2008) Plataforma de conocimiento para el medio rural y pesquero. Disponible en: [http://www.mapama.gob.es/app/MaterialVegetal/docs/SITUACION ACTUAL TOMATE.pdf](http://www.mapama.gob.es/app/MaterialVegetal/docs/SITUACION_ACTUAL_TOMATE.pdf).

Maroto, J. V. (2002) Horticultura. Herbácea especial. Quinta edición. Madrid: Mundi-Prensa.

Maruthi, M. N.; Alam, S. N.; Kader, K. A.; Rekha, A. R.; Cork, A.; Colvin, J. (2005) 'Nucleotide sequencing, whitefly transmission, and screening tomato for resistance against two newly described begomoviruses in bangladesh.', *Phytopathology*, 95(12), pp. 1472–1481.

Monci, F.; Sa, S. (2002) 'A natural recombinant between the geminiviruses tomato yellow leaf curl sardinia virus and tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in spanish populations', 326, pp. 317–326.

Nuez, F. (1995) El cultivo del tomate. Primera edición. Madrid: Mundi-Prensa.

Pérez de Castro, A. M. (2005) 'Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction , PCR)', *Universidad Politécnica de Valencia*, pp. 1–10.

Picó, B.; Ferriol, M.; Díez, M. J.; Nuez, F. (1999) 'Developing tomato breeding lines resistant to tomato yellow leaf curl virus', *Plant Breeding*, 118, pp. 537–542.

Rosen, R.; Kanakala, S.; Klot, A., Pakkianathan, B. C.; Farich, B. A.; Santana-Magal, N.; Elimelech, M., Kontsedalov, S.; Lebedev, G.; Cilia, M.; Ghanim, M. (2015) 'Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors'. *Current Opinion in Virology*, 15, pp. 1–8.

Ruiz, M.; Simón, A.; L. Velasco, M.; García, C.; Janssen, D. (2015) 'First report of tomato leaf curl New Delhi virus infecting tomato in Spain', *Plant Disease*, 99 (6), pp. 894.

Sayed, S. S.; Sayed, S. S.; Sajjad, K.; Anupam, V.; Adel, M. A.; Adeel, G. C.; Ghazi, A. D.; Bikash, M. (2013) 'Characterization of tomato leaf curl New Delhi virus infecting cucurbits: Evidence for sap transmission in a host specific manner', *African Journal of Biotechnology*, 12(32), pp. 5000–5009.

Simón, A.; Ruiz, L.; Velasco, L.; Jnsen, D. (2017) 'Absolute quantification of tomato leaf curl New Delhi virus Spain strain, ToLCNDV-ES: virus accumulation in a host manner.', *Plant Disease*, 102(1), pp. 165-171.

Soler-Aleixandre, S.; López, C.; Cebolla-Cornejo, J.; Nuez, F. (2007) 'Sources of resistance to Pepino mosaic virus (PepMV) in tomato', *HortScience*, 42(1), pp. 40–45.

Soler, S.; Nuez, F. (2004) 'Genes de resistencia en cultivos hortícolas', *Resistencia Genética a Patógenos Vegetales*. Primera edición. Valencia, p. 568.

Srivastava, K. M.; Hallan, V., Raizada, R. K.; Chandra, G.; Singh, B. P.; Sane, P. V. (1995) 'Molecular cloning of Indian tomato leaf curl vims genome following a simple method of concentrating the supercoiled replicative form of viral DNA', *Journal of Virological Methods*, 51(2–3), pp. 297–304.

Tellez, M.; Simon, A.; Rodriguez, E.; Janssen, D. (2017) 'Control of Tomato leaf curl New Delhi virus in zucchini using the predatory mite *Amblyseius swirskii*', *Biological Control*, 114, pp. 106–113.

Varsani, A.; Navas-Castillo, J., Moriones, E.; Hernández-Zepeda, C.; Idris, A.; Brown, J. K.; Murilo Zerbini, F.; Martin, D. P. (2014) 'Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*', *Archives of Virology*, 159(8), pp. 2193–2203.

7 ANEJOS

7.1 Composición del tampón de inoculación

Para 1000 cm³:

- 0,8766 g de NaCl
- 1,0697 g de Na₂HPO₄
- 0,046 g de NaH₂PO₄
- 1 g de PVP
- Ajustar el pH entre 7,2 a 7,4

7.2 Protocolo TAS-ELISA

Protocolo TAS-ELISA para ToLCNDV

Anticuerpo: WmCSV AS-0830

Se utilizaron plantas de tomate infectadas con ToLCNDV así como controles positivos (plantas susceptibles infectadas previamente) y negativos (plantas sanas).

- 1. Obtención de las muestras vegetales.** Se tomaron muestras de hoja apical de plantas inoculadas con ToLCNDV, así como de controles positivos y negativos a los 28 DDI y se introdujeron en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para ser congelados con Nitrógeno líquido a -80°C y ser machados mecánicamente (figura 7.1). En cada tubo se añadió tampón de extracción a razón de 1:20 (peso de muestra, g: volumen de tampón, ml). El extracto obtenido se reserva en nevera a 4°C hasta su utilización.

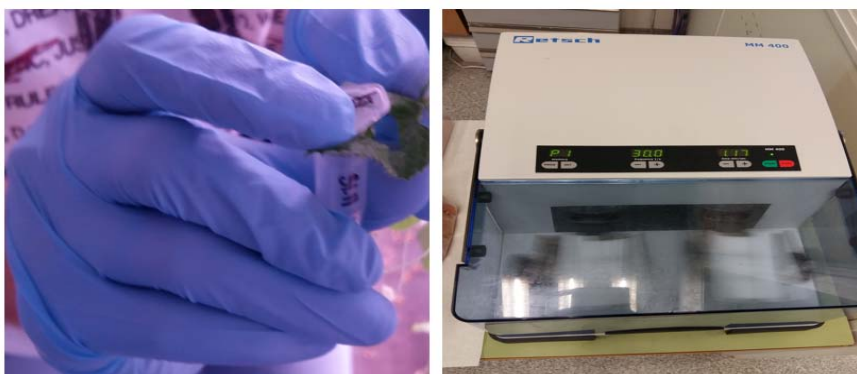


Figura 7.1 Obtención de la muestra vegetal y triturado mecánico.

- 2. Recubrimiento.** Se disuelve el anticuerpo AS-0830 IgG en tampón de recubrimiento (dilución 1:1000). Se llena cada pocillo de una placa de microtitulación para análisis con 100 μ l de la disolución anterior (6 ml/placa), se llenan los bordes con agua destilada, se cubre con una tapa y se deja incubar en estufa durante 4 horas a 37 $^{\circ}$ C (figura 7.1).

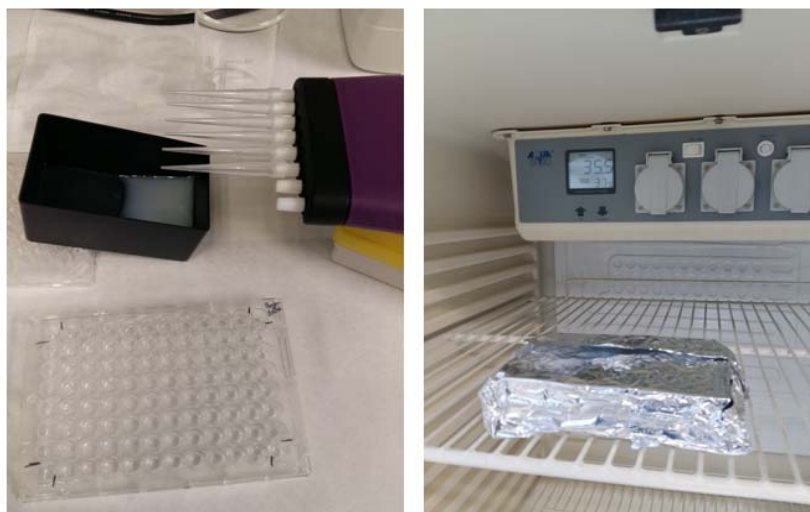


Figura 7.2 Distribución del tampón de recubrimiento en una placa de microtitulación e incubación en estufa.

- 3. Lavado.** Se vació las placas y se eliminó el exceso de reactivo de recubrimiento, realizando cuatro lavados con 200 μ l de tampón de lavado por pocillo. Los dos primeros lavados serán rápidos (no se deja reposar el tapón de lavado), mientras que en los dos siguientes se deja reposar 3 minutos el tampón de lavado en los pocillos. Este paso se realiza de forma automática (figura 7.3).

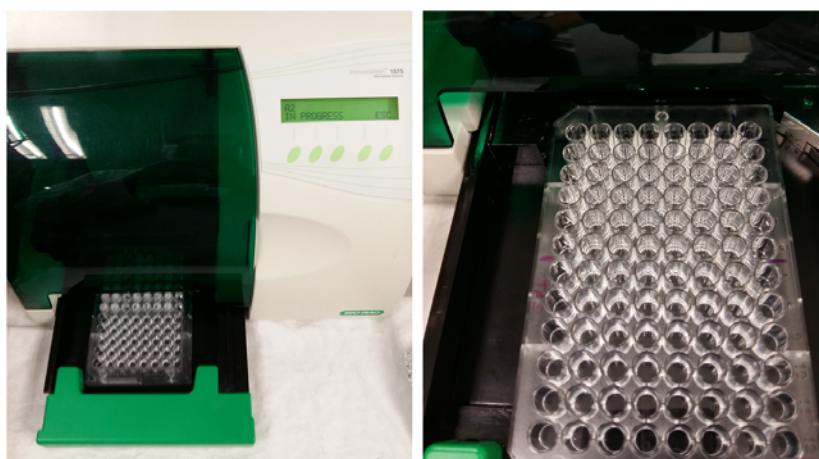


Figura 7.3 Placa de microtitulación en proceso automático de lavado con tampón

4. **Bloqueo de los pocillos.** Añadir 6 ml/placa de tampón de lavado más 2% de Blocking milk e incubar en estufa durante 30 minutos a 37°C.
5. **Formación del antígeno-anticuerpo.** Las muestras a analizar, así como los correspondientes controles positivo, negativo y el blanco (tampón de extracción) se distribuyen en placas a razón de 100 µl por pocillo (6 µl/placa). Se llenan los bordes con agua destilada. Se tapa la placa y se deja incubar al menos 12 horas a 4°C.
6. **Lavado.** Se vaciaron las placas y se lavaron de la forma indicada en el punto 3, pero realizando cinco lavados y manteniendo en los dos últimos el tampón de lavado durante 3 minutos en los pocillos.
7. **Reacción con el conjugado-anticuerpo Mab.** Se llenan los pocillos con 100 µl de la disolución 1:1000 del anticuerpo conjugado (Mab) en tampón conjugado (6 ml/placa). Se llenan los bordes con agua destilada, se tapa la placa y se deja incubar durante 2 horas en estufa a 37°C.
8. **Lavado.** Se vacían las placas y se realizan 5 lavados de la misma forma que en el paso 6.
9. **Reacción con el conjugado-anticuerpo RAM-AP.** Se llenan los pocillos con 100 µl de la disolución 1:1000 del anticuerpo RAM-AP en tampón conjugado (6 ml/placa). Se llenan los bordes con agua destilada, se tapa la placa y se deja incubar durante 2 horas en estufa a 37°C.
10. **Lavado.** Se vacían las placas y se realizan 5 lavados de la misma forma que en el paso 6.
11. **Reacción enzimática.** Se prepara una solución con tampón sustrato y 1,13 mg/ml de p-nitrofenilfosfato disódico. Se añade a cada pocillo 100 µl (excepto los bordes) de esta solución (6ml/placa). Se incuba la placa durante 30 minutos en la estufa a 37°C. La reacción enzimática se detiene añadiendo 50 µl/pocillo de NaOH 3N (figura 7.4).

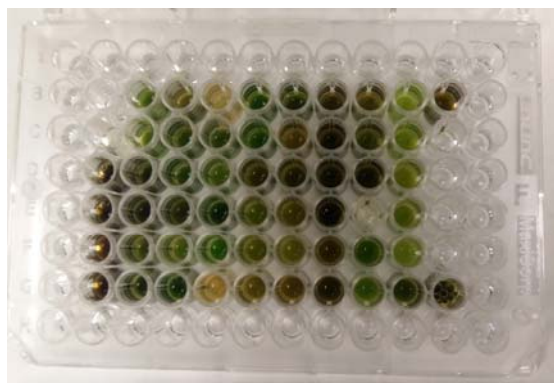


Figura 7.4 Reacción enzimática en placa de microtitulación.

12. Lectura. Se realiza la lectura de absorbancia a 450 nm en un fotómetro Microplate Reader Modelo 550 (Biorad Laboratories, Hercules, USA) (figura 7.5). Se consideró la presencia de muestras positivas cuando la absorbancia sea mayor a la media de las absorbancias de las plantas control más tres veces su desviación típica.

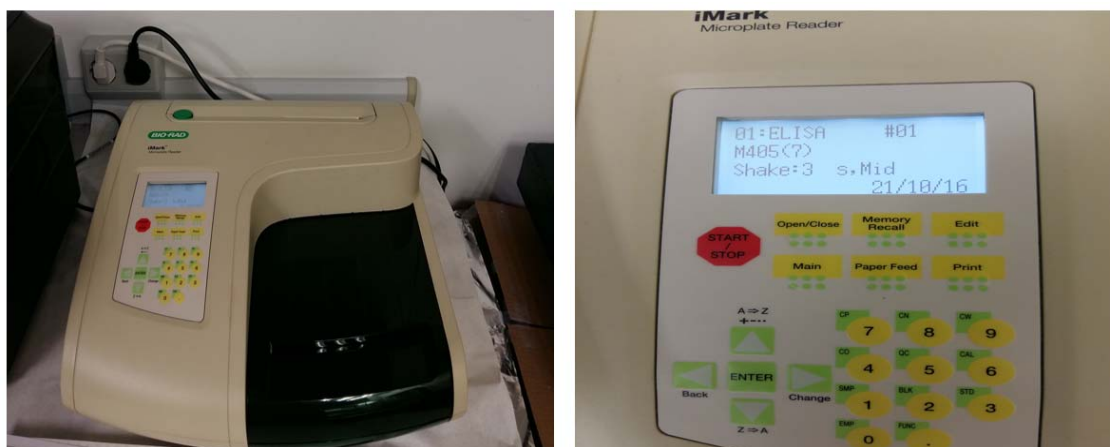


Figura 7.5 Fotómetro para medir la absorbancia

Para el desarrollo de la técnica serológica TAS-ELISA, se utilizaron los siguientes tampones:

Tampón de recubrimiento:

Para 1000 cm³:

- 1,59 g·l⁻¹ de Na₂CO₃
- 2,93 g·l⁻¹ de NaHCO₃
- 0,20 g·l⁻¹ de NaN₃
- Ajustar pH a 9,6

Tampón de lavado:

Para 1000 cm³:

- 8 g·l⁻¹ de NaCl
- 2,9 g·l⁻¹ de Na₂HPO₄*12H₂O
- 0,2 g·l⁻¹ de KH₂PO₄
- 0,2 g·l⁻¹ de KCl
- 0,2 g·l⁻¹ de NaN₃
- 0,5 ml·l⁻¹ de Tween-20
- Ajustar pH a 7,2-7,4

Tampón de extracción:

Se utiliza 1 litro de tampón de lavado al que se le añade:

- 2% de Polyvinil Pirrolidina (viscosidad K10-K40)

Tampón substrato:

Para 1000 cm³:

- 97 ml·l⁻¹ de Dietanolamino
- 0,2 g·l⁻¹ de MgCl₂ * 12 H₂O
- 0,2 g·l⁻¹ de NaN₃
- Ajustar pH a 9,8

7.3 Resultados de los experimentos del Trabajo de Fin de Máster

7.3.1 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una variedad de tomate del tipo varietal 'De Penjar'

Tabla 7.1 Respuesta de la variedad 'De Penjar' (DP) al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	0,50	0,50	2,00	2,00		
2	0,50	2,50	2,00	2,50		
3	0,00	1,00	2,50	3,50		
4	0,50	1,50	2,50	3,00		
5	0,00	0,00	0,00	0,50		
6	0,00	0,50	2,50	3,00		
7	0,00	1,00	2,00	3,00		
8	0,00	1,00	2,00	3,00		
9	0,00	0,50	2,00	3,00	2,84	93,75
10	0,50	0,50	2,00	3,50		
11	0,00	0,50	2,00	3,00		
12	0,50	1,00	2,50	3,50		
13	1,00	1,50	2,50	3,00		
14	0,50	1,00	2,00	3,00		
15	1,00	1,50	2,00	3,00		
16	0,50	1,00	2,00	3,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.2 Respuesta de la variedad 'De Penjar' (DP) al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISM	%PI
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	0,50	3,50	4,00	4,00		
2	0,50	3,00	3,50	4,00		
3	0,50	3,00	3,50	4,00		
4	0,50	2,50	3,50	4,00		
5	0,50	3,00	3,50	4,00		
6	1,00	3,00	4,00	4,00		
7	1,00	3,00	3,50	4,00		
8	0,50	3,50	4,00	3,00	3,88	100
9	0,50	2,50	3,50	3,00		
10	1,00	2,00	3,00	4,00		
11	1,00	3,00	3,50	3,50		
12	1,50	2,50	3,50	4,00		
13	1,00	2,50	3,00	4,00		
14	1,00	3,00	3,50	3,50		
15	1,00	2,50	3,00	3,50		
16	1,50	3,50	4,00	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.3 Respuesta de la variedad 'De Penjar' (DP) al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días (15 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM	%PI
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,00	3,00	4,00	4,00		
2	2,00	3,50	4,00	4,00		
3	1,50	3,50	4,00	4,00		
4	2,00	3,50	4,00	4,00		
5	1,50	3,50	4,00	4,00		
6	1,50	3,50	4,00	4,00		
7	2,00	3,50	4,00	4,00		
8	2,50	3,50	4,00	4,00		
9	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00	100
10	1,50	3,50	4,00	4,00		
11	2,50	3,50	4,00	4,00		
12	2,50	3,50	4,00	4,00		
13	2,00	3,50	4,00	4,00		
14	2,50	3,50	4,00	4,00		
15	3,00	3,50	4,00	4,00		
16	1,50	3,50	4,00	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.4 Respuesta de la variedad 'De Penjar' (DP) al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días (20 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM	%PI
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	1,00	3,50	4,00	4,00		
2	2,00	4,00	4,00	4,00		
3	1,50	4,00	4,00	4,00		
4	2,50	3,50	4,00	4,00		
5	2,50	4,00	4,00	4,00		
6	2,00	4,00	4,00	4,00		
7	1,50	4,00	4,00	4,00		
8	2,50	4,00	4,00	4,00	4,00	100
9	2,00	4,00	4,00	4,00		
10	2,00	4,00	4,00	4,00		
11	2,00	4,00	4,00	4,00		
12	2,00	4,00	4,00	4,00		
13	2,00	4,00	4,00	4,00		
14	2,00	4,00	4,00	4,00		
15	2,00	4,00	4,00	4,00		
16	2,00	4,00	4,00	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

7.3.2 Determinación del período de inoculación con mosca blanca utilizando una colección de variedades tradicionales de tomate

Tabla 7.5 Respuesta de la variedad tradicional AG-3 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	0,50	1,00	1,50	2,00		
2	1,00	1,50	2,00	2,50		
3	1,00	2,00	2,50	3,00		
4	0,50	1,00	1,50	2,00		
5	1,00	1,50	2,00	2,50	2,50	100
6	1,00	2,00	2,50	2,50		
7	1,00	2,00	2,50	3,00		
8	1,00	1,50	2,00	2,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.6 Respuesta de la variedad tradicional BOC-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	0,50	1,00	2,00	2,50		
2	0,50	1,50	2,50	3,00		
3	1,00	1,50	2,00	3,00		
4	0,50	1,00	1,50	2,00		
5	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50	100
6	0,50	1,00	1,50	2,50		
7	1,00	2,00	2,50	3,00		
8	0,50	1,00	1,50	2,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.7 Respuesta de la variedad tradicional FONT-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	0,50	2,00	2,50	3,00		
2	1,50	2,00	3,00	3,50		
3	0,50	1,50	2,50	3,50		
4	0,50	1,00	1,50	2,00		
5	0,50	1,00	2,00	2,50	2,88	100
6	1,50	2,00	2,50	3,00		
7	0,50	1,00	1,50	2,50		
8	0,50	1,00	2,00	3,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.8 Respuesta de la variedad tradicional LJ-4 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	1,00	2,50	2,50	3,00		
2	1,00	1,50	2,00	3,50		
3	1,00	2,00	2,50	3,50		
4	1,00	2,50	3,00	3,50	3,25	100
5	1,50	2,00	3,00	3,50		
6	1,00	1,50	2,00	3,00		
7	1,00	2,50	3,00	3,00		
8	1,00	2,50	3,00	3,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.9 Respuesta de la variedad tradicional O-3 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	0,50	1,00	2,50	3,00		
2	1,00	2,00	2,50	3,00		
3	0,50	1,50	2,50	3,50		
4	1,00	2,00	3,00	3,00	3,44	100
5	0,50	1,00	2,50	3,50		
6	1,00	2,50	3,50	4,00		
7	0,50	2,00	3,50	4,00		
8	1,00	2,50	3,00	3,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.10 Respuesta de la variedad tradicional SJA-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	0,50	1,00	2,00	3,00		
2	0,50	2,50	3,00	3,00		
3	0,50	2,50	2,50	3,00		
4	1,00	2,50	3,00	3,00		
5	1,00	2,00	2,50	3,00	3,00	100
6	0,50	2,00	2,50	3,00		
7	1,00	2,00	2,50	3,00		
8	1,00	2,00	2,50	3,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.11 Respuesta de la variedad tradicional TT-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	1,00	2,00	2,50	3,00		
2	1,00	2,50	3,00	3,00		
3	1,00	2,50	3,00	3,00		
4	0,50	1,00	2,00	3,00		
5	1,00	2,00	2,50	3,00	3,00	100
6	1,00	2,00	2,50	3,00		
7	1,00	1,50	2,00	3,00		
8	0,50	1,00	2,50	3,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.12 Respuesta de la variedad tradicional 'De Penjar' (DP) al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 5 días (5 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	1,00	2,50	3,50	4,00		
2	1,50	2,50	3,00	4,00		
3	1,00	2,00	3,50	4,00		
4	1,00	2,50	3,00	4,00	4,00	100
5	1,00	2,50	3,50	4,00		
6	1,50	3,00	3,50	4,00		
7	1,50	2,50	4,00	4,00		
8	1,50	3,00	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.13 Respuesta de la variedad tradicional AG-3 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	1,00	1,50	2,50	3,00		
2	1,50	2,00	2,50	3,00		
3	1,00	1,50	2,00	2,50		
4	1,50	2,00	2,50	3,00		
5	1,00	2,00	2,50	2,50	2,75	100
6	1,00	1,50	2,00	2,50		
7	1,50	2,00	2,50	3,00		
8	1,00	1,50	2,00	2,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.14 Respuesta de la variedad tradicional BOC-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	1,00	2,50	3,00	3,50		
2	1,00	2,00	2,50	3,00		
3	2,00	2,50	3,00	3,00		
4	1,00	2,00	3,00	3,50		
5	1,00	2,00	3,50	3,50	3,31	100
6	1,00	1,50	2,50	3,50		
7	1,00	2,00	3,00	3,00		
8	1,00	1,50	2,50	3,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.15 Respuesta de la variedad tradicional FONT-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	1,50	2,50	3,50	4,00		
2	2,00	3,50	4,00	4,00		
3	1,50	2,00	3,00	3,50		
4	2,00	3,50	4,00	4,00		
5	2,00	3,00	4,00	4,00	3,88	100
6	1,50	2,50	3,00	3,50		
7	2,00	3,50	4,00	4,00		
8	2,50	3,00	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.16 Respuesta de la variedad tradicional LJ-4 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,00	2,50	3,00	4,00		
2	2,50	3,50	3,50	4,00		
3	2,50	3,50	3,50	4,00		
4	2,50	3,50	3,50	4,00		
5	2,00	2,50	3,00	4,00	4,00	100
6	2,50	3,50	3,50	4,00		
7	2,50	3,50	4,00	4,00		
8	2,50	3,50	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.17 Respuesta de la variedad tradicional O-3 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	1,50	2,00	3,00	3,50		
2	1,00	2,50	3,50	3,50		
3	1,50	2,50	3,50	4,00		
4	1,00	2,50	3,50	4,00		
5	1,00	2,50	3,50	4,00	3,75	100
6	1,00	2,50	3,50	4,00		
7	2,00	2,50	3,00	3,50		
8	2,00	2,50	3,00	3,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.18 Respuesta de la variedad tradicional SJA-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,00	2,50	2,50	4,00		
2	2,50	3,00	3,00	4,00		
3	1,00	2,50	2,50	4,00		
4	1,50	2,50	3,00	4,00		
5	2,00	3,00	3,00	4,00	4,00	100
6	2,50	3,00	3,00	4,00		
7	1,00	2,50	3,00	4,00		
8	1,50	2,50	3,00	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.19 Respuesta de la variedad tradicional TT-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,00	2,50	3,00	3,50		
2	1,00	2,00	3,50	4,00		
3	1,50	2,50	3,50	4,00		
4	1,00	3,50	4,00	4,00		
5	2,00	3,00	3,50	4,00	3,94	100
6	1,00	2,00	3,00	4,00		
7	1,50	2,50	3,50	4,00		
8	1,00	2,00	3,00	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.20 Respuesta de la variedad tradicional 'De Penjar' (DP) al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,00	3,50	3,50	4,00		
2	2,50	3,50	3,50	4,00		
3	2,50	3,50	3,50	4,00		
4	3,00	3,50	3,50	4,00		
5	2,50	3,00	3,50	4,00	4,00	100
6	2,00	3,50	3,50	4,00		
7	3,00	3,00	3,50	4,00		
8	2,50	3,00	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.21 Respuesta de la variedad tradicional AG-3 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días (15 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,00	3,00	4,00	4,00		
2	1,50	2,00	3,00	3,50		
3	2,00	2,50	3,50	4,00		
4	1,50	2,00	3,50	3,50		
5	2,00	3,00	4,00	4,00	3,75	100
6	1,50	2,00	3,00	3,50		
7	2,00	2,50	3,50	4,00		
8	1,50	2,00	3,50	3,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.22 Respuesta de la variedad tradicional BOC-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días (15 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,00	2,50	3,00	3,50		
2	1,50	2,00	2,50	3,50		
3	1,00	2,00	3,00	3,50		
4	2,00	2,50	3,50	4,00		
5	1,50	2,50	3,00	3,50	3,56	100
6	2,00	2,50	3,00	3,50		
7	1,00	2,00	3,00	3,50		
8	1,50	2,00	2,50	3,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.23 Respuesta de la variedad tradicional FONT-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días (15 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	1,50	2,00	3,50	3,00		
2	2,00	3,00	3,50	3,50		
3	2,00	3,00	3,50	4,00		
4	1,50	2,00	3,50	3,50		
5	1,50	2,00	3,50	3,50	3,56	100
6	1,00	2,00	3,00	3,50		
7	2,00	3,00	3,50	4,00		
8	1,50	2,00	3,50	3,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.24 Respuesta de la variedad tradicional LJ-4 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días (15 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,50	3,00	3,50	4,00		
2	2,50	0,50	4,00	4,00		
3	2,00	2,50	3,50	4,00		
4	2,50	3,00	3,50	4,00		
5	2,50	3,00	3,50	4,00	4,00	100
6	2,50	3,00	4,00	4,00		
7	2,50	3,00	3,50	4,00		
8	2,00	2,50	3,00	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.25 Respuesta de la variedad tradicional O-3 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días (15 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,50	3,00	4,00	4,00		
2	2,50	3,00	3,50	4,00		
3	2,00	2,50	3,00	3,50		
4	2,50	3,00	3,50	4,00		
5	1,00	2,00	3,50	3,50	3,81	100
6	2,50	3,00	3,50	4,00		
7	2,50	3,00	3,50	4,00		
8	2,00	2,50	3,50	3,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.26 Respuesta de la variedad tradicional SJA-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días (15 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	1,00	2,50	3,00	3,50		
2	1,50	2,00	3,50	3,50		
3	2,00	3,00	3,50	3,50		
4	1,00	2,50	3,00	3,50		
5	1,50	2,00	3,00	3,50	3,56	100
6	1,50	2,00	2,50	3,00		
7	2,00	2,50	3,50	4,00		
8	1,50	2,50	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.27 Respuesta de la variedad tradicional TT-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días (15 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,00	2,00	2,50	3,50		
2	1,50	2,50	3,00	3,50		
3	2,00	3,00	3,50	4,00		
4	2,00	2,50	3,00	3,50		
5	1,50	2,50	3,50	4,00	3,75	100
6	2,00	2,50	3,00	4,00		
7	2,00	2,50	3,50	4,00		
8	1,50	2,00	3,50	3,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.28 Respuesta de la variedad tradicional 'De Penjar' (DP) al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 15 días (15 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,50	2,50	3,00	4,00		
2	2,50	2,50	3,50	4,00		
3	2,50	3,00	3,50	4,00		
4	2,50	3,00	3,50	4,00		
5	2,50	3,00	3,50	4,00	4,00	100
6	3,00	3,00	4,00	4,00		
7	2,50	3,00	4,00	4,00		
8	2,50	3,00	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación

Tabla 7.29 Respuesta de la variedad tradicional AG-3 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días (20 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,50	3,00	3,50	3,50		
2	2,50	3,00	3,50	4,00		
3	3,00	3,50	4,00	4,00		
4	2,50	2,50	3,50	4,00		
5	2,50	3,00	3,50	3,50	3,75	100
6	2,00	2,50	3,00	3,50		
7	2,50	3,00	3,50	3,50		
8	3,00	3,50	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.30 Respuesta de la variedad tradicional BOC-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días (20 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,50	3,00	3,50	3,50		
2	2,00	3,00	3,50	4,00		
3	2,00	2,50	3,50	4,00		
4	2,00	3,00	3,50	4,00		
5	2,00	3,00	4,00	4,00	3,94	100
6	2,50	3,00	3,50	4,00		
7	2,50	3,00	3,50	4,00		
8	2,50	3,00	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.31 Respuesta de la variedad tradicional FONT-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días (20 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,50	3,00	3,50	4,00		
2	2,50	3,00	3,50	3,50		
3	2,50	3,00	3,50	4,00		
4	3,00	3,50	4,00	4,00		
5	2,50	3,00	3,50	4,00	3,94	100
6	3,00	3,50	4,00	4,00		
7	2,50	3,00	3,50	4,00		
8	2,00	2,50	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.32 Respuesta de la variedad tradicional LJ-4 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días (20 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,50	3,50	4,00	4,00		
2	3,00	3,50	4,00	4,00		
3	3,00	3,50	3,50	4,00		
4	2,50	3,00	4,00	4,00		
5	3,00	3,50	4,00	4,00	4,00	100
6	3,00	4,00	4,00	4,00		
7	2,50	3,00	4,00	4,00		
8	2,50	3,00	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.33 Respuesta de la variedad tradicional O-3 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días (20 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,00	2,50	3,50	4,00		
2	2,00	2,00	3,50	4,00		
3	2,50	2,50	3,50	4,00		
4	2,00	2,50	3,50	4,00		
5	2,00	2,50	3,50	4,00	3,88	100
6	2,00	2,50	3,00	3,50		
7	2,50	3,00	3,50	4,00		
8	2,00	2,50	3,00	3,50		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.34 Respuesta de la variedad tradicional SJA-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días (20 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,00	2,50	3,50	4,00		
2	2,00	3,00	3,50	4,00		
3	2,50	3,00	3,50	4,00		
4	2,50	3,00	4,00	4,00		
5	2,00	3,50	4,00	4,00	4,00	100
6	2,00	3,50	4,00	4,00		
7	2,50	3,00	3,50	4,00		
8	2,50	3,00	3,50	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.35 Respuesta de la variedad tradicional TT-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días (20 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	2,50	3,00	4,00	4,00		
2	2,00	3,50	4,00	4,00		
3	2,50	3,50	4,00	4,00		
4	2,00	2,50	3,50	4,00		
5	2,50	3,50	4,00	4,00	4,00	100
6	2,00	3,00	3,50	4,00		
7	2,50	3,50	4,00	4,00		
8	2,00	3,00	4,00	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

Tabla 7.36 Respuesta de la variedad tradicional 'De Penjar' (DP) al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 20 días (20 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI ²
	Días después de la inoculación					
	7	14	21	28		
1	3,00	3,50	3,50	4,00		
2	3,50	3,50	4,00	4,00		
3	2,50	3,50	4,00	4,00		
4	3,00	3,50	4,00	4,00		
5	2,50	3,00	3,50	4,00	4,00	100
6	3,00	3,50	4,00	4,00		
7	2,50	3,00	4,00	4,00		
8	2,50	3,50	4,00	4,00		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

7.3.3 Comprobación de la eficiencia del método de inoculación con *Bemisia tabaci*

Tabla 7.37 Respuesta de la variedad tradicional AG-3 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,5	4,0	4,0	4,0			0,108	
2	1,0	2,5	3,0	4,0			0,211	
3	0,5	2,5	3,5	3,5			0,259	
4	1,5	3,5	4,0	4,0	3,88	100	0,307	75
5	0,5	3,5	4,0	4,0			0,219	
6	0,5	1,0	3,0	3,5			0,401	
7	1,5	2,0	3,5	4,0			0,313	
8	0,5	4,0	4,0	4,0			0,092	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.38 Respuesta de la variedad tradicional BOC-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,0	1,0	3,0	4,0			0,312	
2	0,5	3,0	3,5	4,0			0,471	
3	0,5	2,0	3,5	4,0			0,486	
4	1,5	4,0	4,0	4,0	3,81	100	0,263	87,50
5	0,0	0,5	1,5	4,0			0,277	
6	0,5	1,0	3,5	4,0			0,088	
7	0,0	0,5	1,0	2,5			0,169	
8	1,0	3,5	4,0	4,0			0,284	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.39 Respuesta de la variedad tradicional FONT-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,0	2,0	2,5	4,0			0,217	
2	0,5	3,0	4,0	4,0			0,014	
3	1,0	3,5	4,0	4,0			0,081	
4	0,5	1,0	1,5	2,0	3,75	100	0,072	37,50
5	0,5	4,0	4,0	4,0			0,182	
6	1,0	0,5	1,5	4,0			0,022	
7	0,5	0,5	0,5	4,0			0,085	
8	0,5	4,0	4,0	4,0			0,303	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.40 Respuesta de la variedad tradicional LJ-4 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,0	0,0	0,0	0,0			-	
2	0,0	0,5	3,5	4,0			0,467	
3	1,0	3,0	4,0	4,0			0,031	
4	3,0	3,5	4,0	4,0	4,00	100	0,484	42,85
5	0,5	2,5	3,5	4,0			0,052	
6	2,5	3,5	4,0	4,0			0,060	
7	1,5	4,0	4,0	4,0			0,027	
8	0,0	2,0	3,5	4,0			0,138	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.41 Respuesta de la variedad tradicional O-3 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	1,5	4,0	4,0	4,0			0,250	
2	0,5	3,0	4,0	4,0			0,370	
3	0,0	0,5	3,5	4,0			0,411	
4	1,0	4,0	4,0	4,0	3,94	100	0,377	75
5	1,0	2,5	3,5	4,0			0,337	
6	0,5	3,0	4,0	3,5			0,083	
7	2,0	4,0	4,0	4,0			0,094	
8	0,5	3,0	4,0	4,0			0,418	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.42 Respuesta de la variedad tradicional SJA-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,5	3,5	4,0	4,0	3,94	100	0,311	87,50
2	0,0	2,0	3,5	4,0			0,279	
3	0,0	0,5	3,0	3,5			0,477	
4	0,0	3,5	4,0	4,0			0,239	
5	1,0	3,0	4,0	4,0			0,521	
6	1,0	3,0	4,0	4,0			0,113	
7	0,5	4,0	4,0	4,0			0,385	
8	0,5	4,0	4,0	4,0			0,184	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.43 Respuesta de la variedad tradicional TT-1 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Plantas	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	1,0	3,5	4,0	4,0	3,88	100	0,401	62,50
2	0,0	3,5	4,0	4,0			0,274	
3	0,0	2,5	3,5	4,0			0,243	
4	0,0	3,0	4,0	3,0			0,017	
5	2,5	4,0	4,0	4,0			0,103	
6	0,0	0,5	3,0	4,0			0,378	
7	0,0	2,5	3,5	3,0			0,095	
8	0,5	2,0	3,0	3,5			0,175	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.44 Respuesta de la variedad tradicional 'De Penjar' (DP) al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Entrada	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	2,5	4,0	3,5	4,0			0,425	
2	1,0	2,0	3,5	4,0			0,092	
3	0,5	0,5	2,5	4,0			0,197	
4	2,0	3,5	4,0	4,0	4,00	100	0,130	62,50
5	1,5	3,5	4,0	4,0			0,028	
6	1,0	3,5	3,5	4,0			0,201	
7	0,0	2,5	4,0	3,5			0,565	
8	1,5	3,0	4,0	4,0			0,444	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

7.3.4 Cribado de una colección de entradas de distintas especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado frente al ToLCNDV

Tabla 7.45 Respuesta de la entrada LA0400 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	0,00	0,50	0,50			0,35	
2	0,00	0,00	1,50	0,50			0,63	
3	0,00	0,00	1,50	0,50			0,26	
4	0,50	0,50	1,50	0,50	1,06	25,00	0,63	100
5	0,50	0,50	1,00	1,00			0,30	
6	0,50	0,50	0,50	0,50			0,45	
7	0,00	0,50	1,00	0,50			0,22	
8	0,00	0,50	0,50	1,00			0,28	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.46 Respuesta de la entrada LA1347 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	1,00	2,50	0,50			0,29	
2	0,00	0,50	2,00	0,50			0,55	
3	0,00	0,00	0,50	0,50	1,19	12,50	0,31	100
4	0,00	0,50	0,50	0,50			0,16	
5	0,00	0,00	3,50	4,00			0,41	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.47 Respuesta de la entrada LA1223 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,50	0,50	4,00	4,00			0,05	
2	0,00	0,50	4,00	4,00	4,00	100,00	0,11	0
3	0,00	0,50	4,00	4,00			0,05	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.48 Respuesta de la entrada LA1322 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,50	1,00	4,00	4,00			0,37	
2	0,00	3,50	3,50	3,00			0,36	
3	0,50	0,50	2,50	3,50			0,06	
4	0,50	0,50	1,00	4,00			0,27	
5	0,50	1,50	4,00	4,00	3,69	100	0,57	87,50
6	2,50	4,00	4,00	1,50			0,17	
7	2,50	2,50	3,00	2,00			0,51	
8	1,50	3,50	2,50	3,50			0,25	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.49 Respuesta de la entrada LA0716 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	0,00	0,50	0,50			0,14	
2	0,00	0,00	0,50	1,00	0,83	66,67	0,20	100
3	0,00	0,50	0,50	1,00			0,30	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.50 Respuesta de la entrada LA0438 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,50	0,50	0,50	0,50	1,75	50,00	0,72	100
2	0,00	0,00	3,00	3,00			0,69	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.51 Respuesta de la entrada LA0483 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	100	0,90	100
2	0,00	0,00	1,00	1,00			0,25	
3	0,00	0,50	0,50	1,00			0,60	
4	0,00	0,00	1,00	1,00			0,41	
5	0,50	0,50	0,50	1,00			0,55	
6	0,00	0,00	1,00	1,00			0,43	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.52 Respuesta de la entrada LA0446 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	0,50	0,50	1,00			0,18	
2	0,50	0,50	1,00	1,00			0,49	
3	0,50	1,00	0,50	2,00			0,53	
4	0,50	1,00	1,00	1,00	1,43	100	0,23	100
5	0,50	0,50	0,50	2,00			0,60	
6	0,50	0,50	1,00	1,00			0,24	
7	0,00	0,00	0,50	2,00			0,36	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.53 Respuesta de la entrada LA0752 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,50	0,50	1,50	2,00			0,40	
2	0,50	0,50	0,50	1,00	1,50	100	0,32	100

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.54 Respuesta de la entrada LA1365 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	0,50	2,00	3,50			0,24	
2	0,50	0,50	1,50	1,00			0,39	
3	0,00	0,50	1,00	0,00			0,32	
4	0,00	0,50	1,00	0,50	1,43	42,86	0,61	100
5	1,00	1,00	1,00	0,50			1,09	
6	0,50	0,50	2,00	1,00			0,73	
7	0,00	0,00	0,00	0,00			0,47	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.55 Respuesta de la entrada LA1982 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	1,00	1,00	1,00			0,32	
2	0,50	1,00	0,50	1,50			0,15	
3	0,00	2,00	3,50	3,00	1,50	20,00	0,20	100
4	0,00	0,50	0,50	1,00			0,17	
5	0,00	0,50	0,50	0,50			0,21	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.56 Respuesta de la entrada LA1346 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	0,50	0,50	0,50			0,02	
2	0,00	0,50	0,50	0,50			0,01	
3	0,50	0,50	0,50	0,50			0,05	
4	0,50	0,50	0,50	1,00			0,05	
5	0,50	0,50	0,50	0,50			0,08	
6	0,00	0,50	0,50	0,50	0,63	25,00	0,19	16,66
7	0,50	0,50	0,50	0,50			0,07	
8	0,00	0,50	0,50	0,50			0,13	
9	0,00	0,50	0,50	1,00			0,10	
10	0,50	0,50	0,50	1,00			0,18	
11	0,00	0,50	0,50	0,50			0,02	
12	0,00	0,50	0,50	0,50			0,14	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.57 Respuesta de la entrada LA1626 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	0,00	1,00	1,50			0,11	
2	0,50	1,00	2,00	2,50	1,88	75	0,16	75
3	0,50	0,50	0,50	3,00			0,15	
4	0,00	0,00	0,50	0,50			0,15	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.58 Respuesta de la entrada LA1932 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	0,00	0,00	0,50				
2	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00		0

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.59 Respuesta de la entrada LA1960 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,00	0,50	0,50	0,50			0,04	
2	0,00	0,50	0,50	1,00			0,00	
3	0,00	0,50	0,50	0,50			0,03	
4	0,50	0,00	0,50	1,00			0,10	
5	0,50	0,50	0,50	0,50			0,00	
6	0,00	0,00	0,00	0,50			0,04	
7	0,00	0,50	0,50	0,50	0,68	21,43	0,46	14,28
8	0,50	0,50	0,50	0,50			0,11	
9	0,00	0,50	0,50	0,50			0,02	
10	0,50	0,50	0,50	0,50			0,01	
11	0,00	1,00	1,00	1,50			0,05	
12	0,00	0,50	1,00	0,50			0,24	
13	0,00	0,00	0,50	0,50			0,03	
14	0,00	0,00	0,50	0,50			0,01	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.60 Respuesta de la entrada LA1274 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,50	0,50	0,50	1,00			0,11	
2	0,50	1,00	0,50	0,50			0,07	
3	0,50	1,50	2,50	3,00			0,30	
4	0,50	1,00	1,00	1,50	1,36	71,43	0,14	28,57
5	0,50	0,50	1,00	1,00			0,08	
6	0,00	0,50	1,50	0,50			0,16	
7	0,50	1,00	1,00	1,00			0,06	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.61 Respuesta de la entrada LA1317 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,50	1,00	1,00	2,00			0,05	
2	0,50	0,50	1,00	2,50			0,02	
3	1,00	1,00	1,50	3,00			0,11	
4	0,50	1,00	1,00	3,00			0,27	
5	0,50	1,00	1,50	3,00			0,01	
6	0,50	2,00	2,50	3,50	3,17	100	0,08	25
7	0,50	1,00	2,50	3,50			0,38	
8	0,00	1,00	2,00	4,00			0,12	
9	0,00	1,50	2,50	3,50			0,06	
10	0,50	0,50	1,50	3,50			0,02	
11	0,50	1,00	2,00	3,00			0,01	
12	0,50	1,00	2,50	3,50			0,25	

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.62 Respuesta de la entrada LA1028 al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	0,50	0,50	0,50	1,00	1,38	0,16	100	
2	0,00	0,50	0,50	1,00		0,30		
3	0,50	0,50	1,50	2,00		0,26		
4	0,50	0,50	1,00	1,50		0,13		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.

Tabla 7.63 Respuesta de la variedad `De Penjar´(DP) al ToLCNDV mediante inoculación con *B. tabaci* durante 10 días (10 DICM). Evaluación temporal de síntomas.

Nro. Planta	Índice de síntomas				ISMM ¹	%PI x Síntomas ²	Absorbancia	% PI x TAS-ELISA ⁴
	Días después de la inoculación						Máxima	
	7	14	21	28			Media ³	
1	2,50	4,00	3,50	4,00	4,00	0,43	62,5	
2	1,00	2,00	3,50	4,00		0,09		
3	0,50	0,50	2,50	4,00		0,20		
4	2,00	3,50	4,00	4,00		0,13		
5	1,50	3,50	4,00	4,00		0,03		
6	1,00	3,50	3,50	4,00		0,20		
7	0,00	2,50	4,00	3,50		0,57		
8	1,50	3,00	4,00	4,00		0,44		

1: Valor medio del índice de síntomas máximos de las plantas en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves).

2: Porcentaje de plantas que presentaron índice de síntomas al menos en una fecha de evaluación.

3: Valor de la absorbancia medida a 405 nm de la reacción serológica TAS-ELISA.

4: Porcentaje de plantas que en base al resultado de TAS-ELISA en hojas apicales, han experimentado síntomas asociados a la infección por ToLCNDV.