

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE  
INGENIEROS AGRÓNOMOS



Departamento de Biotecnología

---

**BÚSQUEDA DE FUENTES DE RESISTENCIA  
AL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO  
DULCE (*Pepino mosaic virus*) EN TOMATE.**

---

TESIS DE MÁSTER  
MÁSTER OFICIAL INTERUNIVERSITARIO  
EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL

**Alumno**  
**PABLO JUTGLÁ MONEDERO**

**Tutor**  
**DR. SALVADOR SOLER ALEIXANDRE**

Diciembre 2009





UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrodiversidad Valenciana

Dr./Dra. **Salvador Soler Aleixandre**, profesor/a del Máster Oficial Interuniversitario en Mejora Genética Vegetal en calidad de tutor/director de Trabajo Fin de Máster por la presente,

## **RECONOCE:**

Que el Trabajo Fin de Máster realizado por el alumno: **Pablo Jutglá Monedero**, con el título:

**“Búsqueda de fuentes de resistencia al virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*) en tomate”**

y dirigido por el doctor **Salvador Soler Aleixandre** reúne las condiciones necesarias para completar la formación del alumno y por tanto

## **AUTORIZA:**

La presentación del citado Trabajo Final de Máster para su defensa ante el correspondiente Tribunal.

Y para que conste a los efectos oportunos así lo firma,

**Dr./Dra. Salvador Soler Aleixandre**  
Máster Oficial Interuniversitario  
en Mejora Genética Vegetal

Valencia, a 9 de diciembre de 2009



## FORMULARIO DEPÓSITO TESIS MÁSTER

<b>AUTOR</b>	1 <sup>er</sup> APELLIDO	2 <sup>o</sup> APELLIDO	NOMBRE	DNI/NIE
	JUTGLA	MONEDERO	PABLO	40335325H
<b>DIRECTOR TESIS</b>	1 <sup>er</sup> APELLIDO	2 <sup>o</sup> APELLIDO	NOMBRE	
	SOLER	ALEIXANDRE	SALVADOR	
	-	-	-	
<b>UNIVERSIDAD</b>		<b>MÁSTER</b>		
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA		MASTER OFICIAL INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL		
<b>TÍTULO DE LA TESIS</b>				
BÚSQUEDA DE FUENTES DE RESISTENCIA AL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE ( <i>Pepino mosaic virus</i> ) EN TOMATE.				
<b>RESUMEN</b>	<p>El PepMV es el agente causal de una enfermedad vírica en tomate que produce graves pérdidas de producción en los cultivos de esta hortaliza en España y otros países del mundo. Con el fin de identificar fuentes de resistencia a esta virosis se ha probado una colección de 23 entradas de distintas especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado (<i>Solanum habrochaites</i>, <i>S. pimpinellifolium</i>, <i>S. peruvianum</i>, <i>S. chilense</i> y <i>S. lycopersicoides</i>). No se han identificado plantas resistentes en ninguna de las entradas de las especies <i>S. peruvianum</i>, <i>S. habrochaites</i> y <i>S. pimpinellifolium</i>. No obstante, una entrada de <i>S. habrochaites</i> parece mostrar tolerancia a la enfermedad ocasionada por el PepMV. Los ensayos realizados sí han permitido identificar algunas plantas resistentes de <i>S. chilense</i> y <i>S. lycopersicoides</i>. Estos resultados permiten abordar el desarrollo de futuras variedades de tomate resistentes al PepMV.</p>			
	<p>Pepino Mosaic Virus (PepMV) is a viric disease in tomato which produces great loss of production in Spain and several other countries in the world. In order to find sources of resistance to this virus, a collection of 23 wild tomato species accessions was screened (<i>Solanum habrochaites</i>, <i>S. pimpinellifolium</i>, <i>S. peruvianum</i>, <i>S. chilense</i> and <i>S. lycopersicoides</i>). <i>S. peruvianum</i>, <i>S. habrochaites</i> and <i>S. pimpinellifolium</i> accessions didn't show any resistance. However, a <i>S. habrochaites</i> accession seems to be tolerant to PepMV disease. The tests have allowed us to identify some resistant plants in <i>S. chilense</i> and <i>S. lycopersicoides</i> accessions. These results allow the developing of PepMV-resistant tomato varieties in the future</p>			
<b>PALABRAS CLAVE</b>	DESCRIPTORES EN ESPAÑOL			
	PepMV ; Solanum ; resistencia (mínimo tres)			
	DESCRIPTORES EN INGLÉS			
	PepMV ; Solanum ; resistance (mínimo tres)			
<b>CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO</b>	URL MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN: <a href="http://ciencia.micinn.fecyt.es/ciencia/jsp/plantilla.jsp?area=plan_idi&amp;id=6&amp;contenido=/files/portada.jsp">http://ciencia.micinn.fecyt.es/ciencia/jsp/plantilla.jsp?area=plan_idi&amp;id=6&amp;contenido=/files/portada.jsp</a>			
	CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA	
	31	08	9	
	31	8	02	



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

--	--	--	--	--

(máximo tres áreas de conocimiento)

## **Agradecimientos:**

Agradecer a D. Salvador Soler su dedicación, entrega y la amplia colaboración en la concepción y elaboración de este trabajo final de master.

Quisiera dar las gracias a las compañeras de laboratorio (Carolina y Julia) por sus gratas conversaciones y por su inestimable ayuda durante la fase práctica de este trabajo final de carrera.

Por último, agradecer a toda mi familia y a toda la gente que me ha apoyado a lo largo de la realización del presente trabajo.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Importancia económica del tomate.....	1
1.2. Principales factores limitantes del cultivo del tomate.....	2
1.3. El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV).....	3
1.3.1. Síntomas en tomate .....	4
1.3.2. Transmisión.....	5
1.3.3. Hospedantes.....	6
1.3.4. Aislados.....	8
1.3.5. Control de la enfermedad.....	8
1.4. Importancia de las especies silvestres en la mejora genética del tomate.....	9
1.4.1. Las especies silvestres relacionadas con el tomate.....	9
1.4.1.1. <i>Solanum chilense</i> .....	10
1.4.1.2. <i>Solanum habrochaites</i> .....	10
1.4.1.3. <i>Solanum lycopersicoides</i> .....	11
1.4.1.4. <i>Solanum peruvianum</i> .....	11
1.4.1.5. <i>Solanum pimpinellifolium</i> .....	12
1.4.2. Utilidad de las especies silvestres en la mejora genética del tomate.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
3.1. Material vegetal.....	16
3.2. Geminación de las semillas.....	17
3.3. Condiciones de cultivo.....	17
3.4. Aislados.....	18
3.5. Método de inoculación.....	18
3.6. Seguimiento de la enfermedad.....	18
3.6.1. Análisis serológico de las muestras.....	18
3.6.2. Sintomatología.....	18
3.7. Comprobación de las plantas seleccionadas.....	20

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1.- Cribado de entradas silvestres para la búsqueda de resistencias al PepMV.....	21
4.1.1. Control susceptible.....	21
4.1.2. <i>S. chilense</i> .....	22
4.1.3. <i>S. habrochaites</i> .....	23
4.1.4. <i>S. lycopersicoides</i> .....	24
4.1.5. <i>S. peruvianum</i> .....	25
4.1.6. <i>S. pimpinellifolium</i> .....	25
4.2. Comprobación de la resistencia de las plantas seleccionadas.....	25
5. CONCLUSIONES.....	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28
7. ANEJOS.....	34

## RESUMEN

El PepMV es el agente causal de una enfermedad vírica en tomate que produce graves pérdidas de producción en los cultivos de esta hortaliza en España y otros países del mundo. Con el fin de identificar fuentes de resistencia a esta virosis se ha probado una colección de 23 entradas de distintas especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado (*Solanum habrochaites*, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. chilense* y *S. lycopersicoides*).

No se han identificado plantas resistentes en ninguna de las entradas de las especies *S. peruvianum*, *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium*. No obstante, una entrada de *S. habrochaites* parece mostrar tolerancia a la enfermedad ocasionada por el PepMV. Los ensayos realizados sí han permitido identificar algunas plantas resistentes de *S. chilense* y *S. lycopersicoides*. Estos resultados permiten abordar el desarrollo de futuras variedades de tomate resistentes al PepMV.

## ABSTRACT

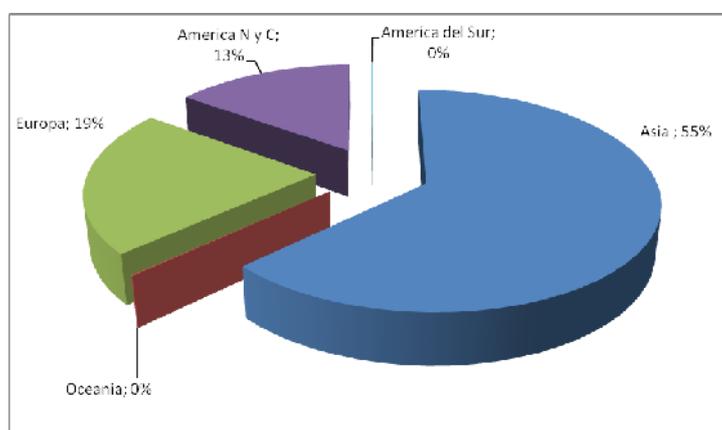
*Pepino Mosaic Virus* (PepMV) is a viric disease in tomato which produces great loss of production in Spain and several other countries in the world. In order to find sources of resistance to this virus, a collection of 23 wild tomato species accessions was screened (*Solanum habrochaites*, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. chilense* and *S. lycopersicoides*).

*S. peruvianum*, *S. habrochaites* and *S. pimpinellifolium* accessions didn't show any resistance. However, a *S. habrochaites* accession seems to be tolerant to PepMV disease. The tests have allowed us to identify some resistant plants in *S. chilense* and *S. lycopersicoides* accessions. These results allow the developing of PepMV-resistant tomato varieties in the future.

## 1.INTRODUCCIÓN

### 1.1. Importancia económica del tomate

A nivel mundial, el tomate es la segunda hortaliza en cuanto a volumen de producción (126.246.708 t.) y con mayor superficie de cultivo (4.626.232 Ha.). La producción de esta hortaliza se ha visto incrementada en las últimas décadas debido tanto al uso de fertilizantes y productos fitosanitarios, como al desarrollo de nuevas variedades más productivas. Por continentes (figura 1), Asia ocupa el primer lugar mundial tanto en producción, con el 55%, como en superficie, con el 60%. Por países, China es la principal productora de tomate, seguida de los Estados Unidos (F.A.O., 2007).



**Figura 1:** Distribución mundial de la producción de tomate en el año 2007 ( F.A.O., 2007).

En la Comunidad Europea, Italia es el primer productor, seguido de España, aunque los mayores rendimientos se obtienen en Holanda (445,16 t./Ha.) (F.A.O.,2007), debido a que se trata en su mayor parte de cultivo protegido (tabla 1).

**Tabla 1:** Producción de tomate en la Comunidad Europea en el año 2007 (F.A.O., 2007).

Estado	Producción total (t.)	Superficie (Ha.)	Rendimiento t./Ha.
Italia	6.025.613	118.224	50,97
España	3.666.410	55.600	65,94
Grecia	1.460.640	26.500	55,12
Portugal	1.000.000	12.500	80,00
Francia	750.000	4.500	166,67
Holanda	690.000	1.550	445,16
<b>Total Europa</b>	<b>20.497.560</b>	<b>594.643</b>	<b>34,47</b>

En España, el tomate aporta el 23% del valor de la producción del sector hortícola y ocupa el 14% de la superficie de cultivo en dicho sector, con 34.018 Ha. Además, es el principal cultivo protegido tanto en superficie como en rendimiento. Un 70% de la producción nacional se destina a consumo de tomate fresco y un 30% a tomate para industria (MARM, 2008). La principal comunidad autónoma en cuanto a superficie de cultivo y producción de esta hortaliza es Extremadura, seguida de Andalucía (tabla 2).

**Tabla 2:** Superficie (Ha.) y producción (t.) de tomate cultivado en España (MARM,2008).

<b>C. Autónoma</b>	<b>Superficie secano</b>	<b>Superficie regadío</b>	<b>Superficie invernadero</b>	<b>Superficie total</b>	<b>Producción 2006</b>
Extremadura	0	16.389	10	16.400	2.014.500
Andalucía	2	2.291	4.270	6.563	1.034.700
Navarra	0	3.528	122	3.650	114.500
C. La Mancha	635	596	31	1.262	104.600
C. Valenciana	48	484	188	701	108.377
Cataluña	32	434	187	653	84.229
Aragón	0	563	59	622	105.500
R. Murcia	28	43	545	616	205.000
La Rioja	0	65	39	104	14.340
<b>Total España</b>	<b>842</b>	<b>25.028</b>	<b>8.148</b>	<b>34.018</b>	<b>3.800.552</b>

## **1.2. Principales factores limitantes del cultivo del tomate**

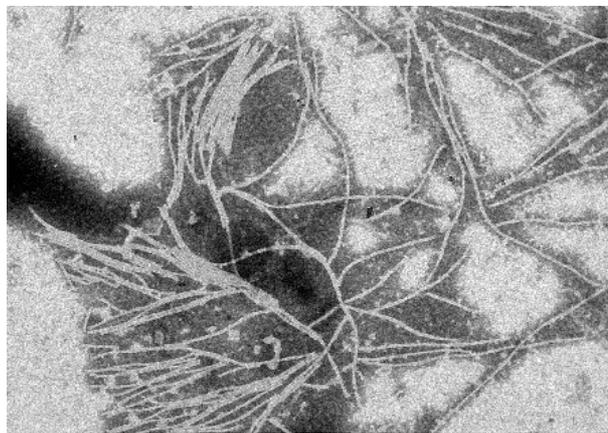
Existen un gran número de plagas, enfermedades no víricas y virosis que afectan a la productividad del cultivo del tomate. La mayoría de estos factores limitantes admiten utilizar un control preventivo o curativo basado tanto en prácticas culturales adecuadas como en la realización de tratamientos biológicos y/o químicos. Estas estrategias no son eficaces en muchas ocasiones, especialmente en el caso de enfermedades de etiología viral. Es necesario, en este caso, desarrollar variedades resistentes. Por otra parte, el uso de la resistencia genética permite disminuir el uso de productos químicos utilizados en los tratamientos fitosanitarios, con la consecuente disminución del impacto ambiental asociado.

Debido a la gran importancia económica del cultivo del tomate, se realiza un considerable esfuerzo en la investigación y desarrollo de variedades de alto rendimiento

que incorporen resistencias a diferentes enfermedades. Este esfuerzo se desarrolla de manera continua, ya que los nuevos cultivares son de vida comercial corta debido a la aparición frecuente de nuevas enfermedades víricas, y a que aparecen razas de virosis que superan las resistencias existentes. Las importantes pérdidas económicas que ocasionan las virosis en las últimas décadas las ha convertido en los principales factores limitantes de la producción de tomate (Roselló *et al.*, 1996; Picó *et al.*, 1996) y de otras hortalizas. El hecho de no disponer de medios curativos al alcance del agricultor y la elevada facilidad de transmisión de muchas virosis (mecánica o mediante vector), hace que los métodos preventivos se muestren en muchos casos ineficientes. Una de las últimas virosis aparecida en suelo español es el PepMV (*Pepino Mosaic Virus*). Para este virus no se dispone en la actualidad de variedades comerciales resistentes. La aparición de dicho virus ha generado una preocupación en las zonas productoras de tomate por las pérdidas económicas que ocasiona y la facilidad de propagación.

### **1.3. El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV)**

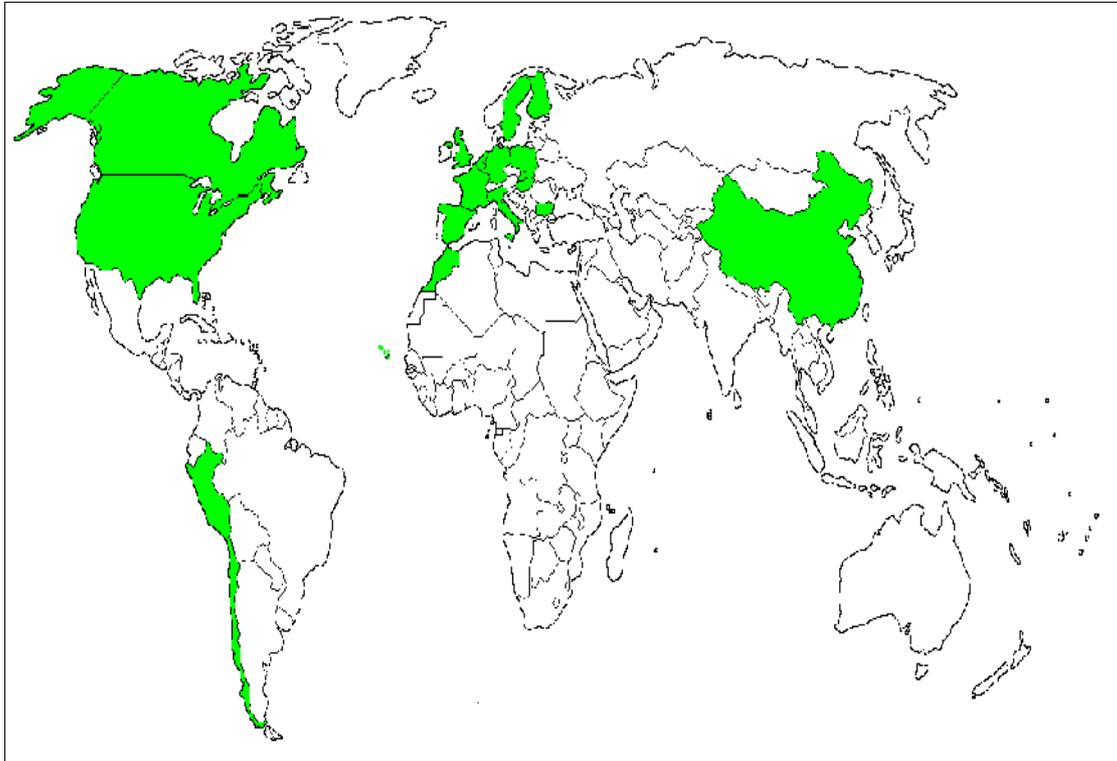
El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) se detectó por primera vez en el año 1974 en Perú al analizar plantas de pepino dulce (*Solanum muricatum* Aiton) infectadas. Este virus fue adscrito al género *Potexvirus* (Jones *et al.*, 1980).



**Figura 2:** Partículas flexuosas de PepMV observadas al microscopio electrónico. Fuente: Laboratorio de Virología Vegetal (Dpto. Ecosistemas Agroforestales, ETSIA, UPV).

En 1999, se detectó por primera vez este virus en Europa en cincuenta invernaderos de Holanda ( Van der Vlugt *et al.*, 2000). Posteriormente, en el año 2000, fue descrito en diferentes países del resto de Europa, entre ellos España (Jordá *et al.*, 2000), seguramente debido a la introducción de materiales vegetales de solanáceas infectadas. En febrero del año 2000, el virus fue incluido en la Lista de Alerta de la

European Plant Protection Organization (E.P.P.O.). La rápida expansión del virus en Europa es un claro ejemplo de cómo la internacionalización de la economía contribuye a la difusión de enfermedades en el sector hortícola. En la actualidad se ha detectado PepMV en varios países de América del Norte y del Sur, Europa, África y Asia (figura 3).



**Figura 3:** Países donde se ha detectado PepMV (E.P.P.O., 2006; Hanssen et al., 2009).

El daño causado por el virus es variable, dependiendo de varios factores. Algunos autores describen pérdidas en producción cercanas al 15%, y hasta el 20% cuando se presenta el virus en combinación con el hongo *Verticillium dahliae* (Buck et al., 2002; Hanssen et al., 2009). En algunas comunidades autónomas españolas, como la Región de Murcia, las pérdidas alcanzaron hasta el 40% de la producción en las parcelas afectadas (Soler et al., 2000).

### **1.3.1. Síntomas en tomate**

El tipo e intensidad de los síntomas observados en plantas de tomate infectadas por PepMV es variable dependiendo de varios factores: cultivar, edad de la planta, vitalidad y condiciones ambientales, especialmente la luz y la temperatura (Cordoba et al., 2002; Hanssen et al., 2009). A menudo en estado de planta juvenil los síntomas pueden desaparecer o tornarse vagos, apareciendo posteriormente.

Los principales síntomas son:

- Mosaicos amarillentos en hojas (figura 4).
- Decoloraciones de frutos (figura 5).
- Enrollamiento y deformación de hojas con aspecto filiforme (figura 6).
- Marchitamiento más o menos grave de plantas (figura 7).



**Figura 4:** Hoja de planta de tomate afectada por PepMV  
(<http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/pepmu.htm>).



**Figura 5:** Síntomas en fruto producidos por PepMV  
(<http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/pepmu.htm>).



**Figura 6:** Hojas filiformes por PepMV  
( fotografía del autor).



**Figura 7:** Marchitamiento de hojas producido por PepMV en tomate (Spence *et al.*, 2006).

### 1.3.2. Transmisión

La transmisión mecánica del virus PepMV tiene una elevada eficiencia, constituyendo la forma de transmisión más importante las diferentes labores de cultivo

como, por ejemplo, la poda y la recolección. Se han detectado partículas virales infecciosas en la ropa de trabajo hasta 14 días después del contacto con plantas infectadas (Lacasa et al., 2001; Stijger, 2002). También se ha demostrado la transmisión por semilla del PepMV (hasta un 2%; Cordoba *et al.*, 2007). Aunque la eficiencia de la transmisión es baja, la elevada facilidad en la transmisión mecánica del virus implica que el paso del PepMV de un ciclo de cultivo a otro a través de la semilla puede jugar un papel muy importante en la epidemiología de esta enfermedad (Hanssen *et al.*, 2009). Un tratamiento químico o térmico adecuado evitaría la infección (Lacasa et al., 2001).

Por lo que respecta a la infección por vectores, no es transmitido por buena parte de los insectos vectores de otros virus que afectan al tomate (Lacasa *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha observado que los abejorros (*Bombus spp.*) utilizados para polinización en cultivo protegido son capaces de propagar el virus de una planta a otra (Lacasa *et al.*, 2003; Shipp *et al.*, 2008).

### 1.3.3. Hospedantes

Se ha comprobado la existencia de especies hospedantes de las familias Solanáceas, Cucurbitáceas y Malváceas, entre otras (tabla 3). Estas especies pueden actuar como reservorios de la enfermedad en las proximidades de las explotaciones .

**Tabla 3** : Especies hospedantes del PepMV.

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b>Síntomas <sup>(1)</sup></b>	<b>Transmisión <sup>(2)</sup></b>
<i>Aizoaceae</i>	<i>Tetragonia expansa</i>	INS	E
	<i>T. tetragonioides</i>	INS	E
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus retroflexus</i>	INS	E
	<i>Gomphrena globosa</i>	INS	E
<i>Asteraceae</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>	-	N
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	INS	E
	<i>C. quinoa</i>	INS	E
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis sativus</i>	INS	E

Fuente: Adaptado de Jones *et al.* 1980; Brunt *et al.*, 1996; Soler *et al.* 2000; Salomone *et al.* 2002.

- (1) INS: Infección no sistémica.  
 +: Infección sistémica con expresión de síntomas.  
 -: Infección sistémica sin expresión de síntomas.
- (2) E: Experimental.  
 N: En condiciones naturales.

**Tabla 3 (continuación)** : Especies que se han demostrado hospedantes del PepMV.

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b>Síntomas <sup>(1)</sup></b>	<b>Transmisión <sup>(2)</sup></b>
<i>Leguminosae</i>	<i>Vigna sinensis</i>	+	E
<i>Malvaceae</i>	<i>Malva parviflora</i>	-	N
<i>Solanaceae</i>	<i>Capsicum annum</i>	-	E
	<i>C. pubescens</i>	-	E
	<i>Datura metel</i>	+	E
	<i>D. stramonium</i>	+	E
	<i>Nicandra physaloides</i>	+	E
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	+	E
	<i>N. bigelovii</i>	+	E
	<i>N. clevelandii</i>	+	E
	<i>Physalis floridana</i>	-	E
	<i>P. peruviana</i>	-	E
	<i>Solanum brachycarpum</i>	-	E
	<i>S. brevidens</i>	-	E
	<i>S. cardiophyllum</i>	+	E
	<i>S. chancayense</i>	-	E
	<i>S. chesmanii</i>	+	E
	<i>S. demissum x S.tuberosum</i>	-	E
	<i>S. esculentum var. Cerasif.</i>	+	E
	<i>S. lycopersicum</i>	+	N
	<i>S. megistacrolobum</i>	-	E
	<i>S. melodeon</i>	+	E
	<i>S. microdot</i>	+	E
	<i>S. mochicense</i>	+	E
	<i>S. moricatum</i>	+	N
	<i>S. nigrum</i>	+/-	N
	<i>S. parviflorum</i>	+/-	N
	<i>S. pennelli</i>	+	N
	<i>S. peruvianum</i>	+/-	E
	<i>S. pimpinellifolium</i>	+	N
	<i>S. raphanifolium</i>	-	E
	<i>S. stenotomum</i>	+	E
	<i>S. stoloniferum</i>	+	E

Fuente: Adaptado de Jones *et al.*, 1980; Brunt *et al.*, 1996; Soler *et al.*, 2000; Salomone *et al.*, 2002.

- (1) INS: Infección no sistémica.  
 +: Infección sistémica con expresión de síntomas.  
 -: Infección sistémica sin expresión de síntomas.  
 +/-: Infección sistémica con expresión de síntomas dependiendo del cultivar.
- (2) E: Experimental.  
 N: En condiciones naturales.

Recientemente se han añadido a la lista de hospedantes del PepMV las especies *Solanum melongena* y *Solanum tuberosum*, de la familia Solanáceas (Hanssen *et al.*, 2009), *Ocimum basilicum* (Lamiáceas) (Davino *et al.*, 2009), y las especies *Chenopodium murale* (Amarantáceas), *Calystegia sepium* (Convolvuláceas), *Diploaxis erucoides* (Brasicáceas), *Heliotropium europaeum* (Boragináceas), *Sonchus tenerrimus* (Asteráceas), *Plantago afra* (Plantagináceas), y *Rumex* sp. (Poligonáceas), entre otras (Córdoba *et al.*, 2004).

#### **1.3.4. Aislados**

En base a su diversidad genética, los aislados de PepMV se pueden dividir en tres razas: Europea, Peruana y Americana (aislados US1 y US2). Las secuencias nucleotídicas de la mayoría de aislados europeos muestran una similitud del 99% entre ellas, mientras que presentan una homología del 96% con la raza Peruana y del 79-82% con la US2.

Los resultados de diversos análisis genéticos sugieren un mismo origen para los aislados europeos del PepMV que habrían surgido a partir del aislado original de Perú. En este sentido, las diferencias entre los aislados europeos y el sudamericano han sido empleadas como justificante para distinguir dos razas de virus: la raza Pepino o PepMV-Pe y la raza Tomate o PepMv-To (Van der Vlug *et al.*, 2002).

Respecto a los aislados españoles, se ha observado un rango de identidades nucleotídicas y aminoacídicas cercano al 100% en aislados procedentes de diferentes puntos del Sudeste español (Martín-Bretones *et al.*, 2002).

#### **1.3.5. Control de la enfermedad**

Teniendo en cuenta la ausencia de tratamientos fitosanitarios curativos para el control de las enfermedades de etiología viral, el único método de control en campo que se puede establecer es la adopción de prácticas culturales preventivas, tales como: desinfección de herramientas, uso de material libre de virus, eliminación de restos infectados, etc. Sin embargo, debido a su elevada eficiencia de transmisión, el control de la enfermedad producida por el PepMV es extremadamente complicado, constituyendo el uso de la resistencia genética la mejor herramienta para la lucha contra la enfermedad a medio y largo plazo.

En diferentes zonas de Perú se ha detectado la presencia del virus en poblaciones aisladas de especies silvestres de tomate (*Solanum chilense* Dun., *S. chimielewskii* Rick., *S. parviflorum* y *S. peruvianum* (L.) Mill.; (Soler *et al.*, 2002). La presencia natural del virus hace posible el encontrar poblaciones con resistencia al virus debido a un proceso de co-evolución con el patógeno. Así, por ejemplo, se ha detectado presencia viral en *S. peruvianum* sin aparición de síntomas (Jones *et al.*, 1980). La búsqueda de fuentes de resistencia al PepMV es, por tanto, de sumo interés.

No se han encontrado aún fuentes de resistencia en la especie cultivada (Ling, 2007a). En cambio, se han encontrado distintos niveles de resistencia en especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado, como *Solanum ochrantum* y *S. pseudocapsicum* (Soler *et al.*, 2007). Dado que estas especies no cruzan con el tomate cultivado, los esfuerzos se han dirigido hacia la búsqueda de resistencia en especies que sí presenten esta posibilidad. En este sentido, se han detectado ciertos niveles de resistencia en algunas entradas de *S. chilense* (Soler *et al.*, 2007) y en *S. habrochaites* (Ling *et al.*, 2007). Sin embargo, estas resistencias parecen consistir en una tolerancia al virus, y no se ha citado la identificación de otras resistencias hasta la actualidad.

#### **1.4. Importancia de las especies silvestres en la mejora genética del tomate**

Los cultivares modernos de tomate presentan una estrecha base genética debido a los cuellos de botella producidos durante la domesticación y posterior introducción desde América Central a Europa. También se han perdido algunos genotipos por el desplazamiento de variedades locales y tradicionales por variedades modernas más productivas. Así, cuando se quieren desarrollar nuevas variedades, se constata la ausencia de resistencia genética a la mayoría de enfermedades en la especie cultivada. En este contexto, las especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado representan una fuente muy importante de variación genética de gran utilidad para el desarrollo de nuevas variedades comerciales de tomate, con características como mejor calidad y producción, tolerancia a factores ambientales, y resistencia a patógenos.

La transferencia de los caracteres identificados es un proceso crucial en el desarrollo de nuevas variedades de tomate. En ocasiones, esta transferencia puede verse dificultada debido a la existencia de barreras de cruzabilidad. Algunas de estas barreras pueden superarse con determinadas técnicas de fertilización o cultivo *in vitro* (Rick, 1980).

### 1.4.1. Las especies silvestres relacionadas con el tomate

Se describen a continuación las especies utilizadas en el presente trabajo.

#### 1.4.1.1. *Solanum chilense* (Dun.) Reiche

Habita los desiertos del sur de Perú y norte de Chile hasta los 3000 m.s.n.m. Resistente a sequías y a diferentes plagas (*Trialeurodes vaporariorum*, *Heliothis armigera*) y virus (TYCLV, TMV). Como en el caso de *S. peruvianum*, también precisa de técnicas especiales para obtener híbridos viables con *Solanum lycopersicum*.



**Figura 8:** *Solanum chilense* en su hábitat natural.  
(<http://tgrc.ucdavis.edu/Images/79-403-LA1971-SAL3212-low.jpg>)

#### 1.4.1.2. *Solanum habrochaites* Knapp. (= *L. hirsutum* Dun.)

Especie que se encuentra a grandes altitudes desde el sur de Ecuador hasta el Perú central, entre los 500 y 2.500 m.s.n.m. Es fácilmente cruzable con *S. lycopersicum* (Rick, 1979). Presenta una gran tolerancia al frío y se ha utilizado como fuente de resistencia a bajas temperaturas. Además, presenta resistencia a estreses bióticos debido al contenido de la planta en sesquiterpenos, sustancias tóxicas segregadas por los pelos glandulares que confieren resistencia a una gran cantidad de plagas como *Heliothis zea*, *Heliothis armigera*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus persicae*, *Lyriomya sativa*, y *Aphis gossypii*. También resiste a enfermedades bacterianas (*Corynebacterium michiganense*, *Pseudomonas tomato*), enfermedades fúngicas (*Alternaria solani*, *Cladosporium fulvum*, *Septoria lycopersici*), nemátodos (*Globodera pallida*, *Meloidogyne ssp.*) y a algunos virus (TYCLV, TSWV y el virus del mosaico del tabaco, TMV).



**Figura 9:** Detalles de hoja y flor de *Solanum habrochaites*  
(<http://tgrc.ucdavis.edu/Images/79-025-LA1918-SAL3160-low.jpg>).

#### 1.4.1.3. *Solanum lycopersicoides* Dun.

Especie que sólo cuenta con pequeñas poblaciones fragmentadas en zonas de Chile y Perú. Habita entre los 1.500 y los 3.700 m.s.n.m. en condiciones de sequedad. Presenta características de interés (tolerancia a bajas temperaturas, resistencia a enfermedades, etc.), que pueden ser transferidas por mejora convencional al tomate cultivado.



**Figura 10:** Inflorescencias y frutos de  
*Solanum lycopersicoides*  
(<http://tgrc.ucdavis.edu/Images/86CC816-LA2776-SAL7534-lyc-Perquejeque-low.jpg>).



**Figura 11:** Diversidad foliar en *Solanum lycopersicoides*  
(<http://tgrc.ucdavis.edu/Images/lyc-leaf.jpg>).

#### 1.4.1.4. *Solanum peruvianum* L.

Es la especie con mayor variación genética dentro del género (Nuez, 1995). Se encuentra en zonas desérticas del centro de Perú y norte de Chile, en un rango de altitud de 0-3.600 m.s.n.m. (metros sobre el nivel del mar). En diversas poblaciones se ha encontrado tolerancia a salinidad y a bajas temperaturas. También es resistente a

numerosas plagas (*Heliothis armigera*, *Macrosiphum euphorbiae*, y *Tetranychus marianae*), a diversos virus como el virus del bronceado del tomate (TSWV), el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus del mosaico del tomate (ToMV) y el virus de la cuchara (TYCLV), a enfermedades fúngicas (*Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dailae*, *Septoria lycopersici*, *Cladosporium fulvum*), a enfermedades bacterianas (*Corynebacterium michiganense*) y a nemátodos (*Meloidogyne incognita*). Su hibridación con *Solanum lycopersicum* es dificultosa, sin embargo es posible producir híbridos fértiles con tomate cuando se utilizan técnicas especiales como el cultivo de embriones y la hibridación somática (Rick, 1978 y 1980). También se han conseguido híbridos cuando *S. lycopersicum* actuó como genitor femenino (Ayuso *et al.*, 1986).



**Figura 12:** Hoja, frutos y flores de *S. peruvianum*  
(<http://tgrc.ucdavis.edu/Images/79-721-LA1981-SAL3222-low.jpg>).

#### 1.4.1.5. *Solanum pimpinellifolium* L.

Especie original de valles costeros de Perú y Ecuador. Presenta una morfología similar al tomate cultivado, aunque con hojas, flores y frutos de tamaño más reducido. Es compatible con *S. lycopersicum* y se ha utilizado como fuente de resistencia a enfermedades, tanto de origen vírico (TYCLV), fúngico (*Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Cladosporium fulvum*, *Septoria lycopersici*, *Alternaria solani*), bacterianas (*Corynebacterium*, *Pseudomonas tomato*, *Pseudomonas solanacearum*) y plagas (*Spodoptera exigua*, *Heliothis zea*, *Heliothis armigera*). También ha sido utilizada en la mejora de parámetros de calidad, como el color del fruto y el contenido en ácido ascórbico.



**Figura 13:** Hojas, flores y frutos de *Solanum pimpinellifolium*  
(<http://tgrc.ucdavis.edu/Images/EP227-LA2102-SAL4941-pim-EI%20Lucero-low.jpg>).

#### **1.4.2. Utilidad de las especies silvestres en la mejora genética del tomate**

Las especies silvestres del género *Solanum* constituyen los recursos fitogenéticos cercanos al tomate cultivado, en los cuales es interesante proceder a la búsqueda de variación genética ausente en la especie cultivada para distintos caracteres, por ejemplo la resistencia a virosis (tabla 4).

**Tabla 4:** Fuentes de resistencia a enfermedades víricas en el tomate cultivado y especies relacionadas (género *Solanum*).

<b>Gen</b>	<b>VIRUS</b>	<b>Fuente de resistencia</b>	<b>Control genético<sup>1</sup></b>	<b>Referencia</b>
<i>Am</i>	AMV	<i>S. hirsutum</i>	M, D	Parrella-G <i>et al.</i> , 1998
<i>Cmr</i>	CMV	<i>S. chilense</i>	M, D	Stamova y Chetelat, 2000
pot-1	PVY	<i>S. hirsutum</i>	M, r	Parrella-G <i>et al.</i> , 2002
pot-1	TEV	<i>S. hirsutum</i>	M, r	Parrella-G <i>et al.</i> , 2002
Sw1	TSWV	<i>S. esculentum</i>	M, D	Finlay, 1953
Swb1	TSWV	<i>S. esculentum</i>	M, D	Finlay, 1953
Sw2	TSWV	<i>S. esculentum</i>	M, r	Finlay, 1953
Sw3	TSWV	<i>S. esculentum</i>	M, r	Finlay, 1953
Sw4	TSWV	<i>S. esculentum</i>	M, r	Finlay, 1953
Sw5	TSWV	<i>S. peruvianum</i>	M, D	Stevens-MR <i>et al.</i> , 1995
<i>Tm1</i>	ToMV	<i>S. hirsutum</i>	M, ID	Hall, 1980
<i>Tm2</i>	ToMV	<i>S. peruvianum</i>	M, D	Young-ND <i>et al.</i> , 1989
<i>Tm2</i>	ToMV	<i>S. peruvianum</i>	M, D	Hall, 1980
<i>Ty</i>	TYLCV	<i>S. chilense</i>	M, D	Stevens-MR <i>et al.</i> , 1995

<sup>(1)</sup> Control genético<sup>1</sup>: M: monogénico; D: dominante; ID: dominancia intermedia; r: recesivo

En el mundo de la mejora vegetal, es importante tener acceso a colecciones de recursos fitogenéticos relacionados con la especie hortícola a mejorar. Dichas

colecciones conservan una fracción de la variabilidad existente en poblaciones naturales; en estas poblaciones puede haber ocurrido un proceso de co-evolución con los diferentes organismos patógenos, lo que hace posible encontrar individuos resistentes. En el caso del virus PepMV, interesa encontrar fuentes de variación para la resistencia al mismo. Se ha comprobado la presencia de PepMV en poblaciones naturales de las especies *S. chilense*, *S. lycopersicum*, *S. chimielewskii*, *S. parviflorum*, *S. pennellii*, *S. peruvianum* y *S. pimpinellifolium* en el Centro y Sur de Perú (Soler *et al.*, 2002).

En este trabajo se va a realizar la búsqueda de fuentes de resistencia al PepMV en una colección de entradas de 5 especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado.

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

El trabajo de investigación que aquí se presenta se ha realizado en el marco de la línea de desarrollo de variedades de tomate resistentes al virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV).

En anteriores investigaciones realizadas en busca de genes de resistencia al PepMV no se ha manifestado resistencia en varias especies relacionadas con el tomate cultivado. Sí se han detectado ciertos niveles de resistencia en especies como *S. chilense* y *S. peruvianum*.

Los objetivos propuestos para este trabajo final de máster han sido los siguientes:

- Búsqueda de nuevas fuentes de resistencia al virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) mediante la inoculación mecánica de este virus de una colección de entradas de varias especies del género *Solanum*. Posteriormente, mediante análisis serológico, se seleccionarán aquellas entradas resistentes al virus.
- Selección de aquellas entradas o plantas que muestren un mejor comportamiento frente a la inoculación mecánica con PepMV.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Se ha utilizado una colección de 23 entradas. De estas, 8 pertenecen a la especie *S. chilense*, 3 a *S. habrochaites*, 3 a *S. lycopersicoides*, 3 a *S. peruvianum* y 3 a *S. pimpinellifolium*.

**Tabla 5:** Colección de entradas utilizadas en el ensayo de cribado.

Espece	Entrada	País	Localidad	Departamento
<i>Solanum chilense</i>	CH-57/3	Chile	Quisama	Tarapacá
	CH-62/5	Chile	Mocha	Tarapacá
	LA-1963	Perú	Río Caplina	Tacna
	LA-1971	Perú	Palquilla	Tacna
	LA-2762	Chile	Mamina	Tarapacá
	PER-526	Perú	Moquegua	Moquegua
	PER-527	Perú	Moquegua	Moquegua
	PER-560	Perú	Tacna	Tacna
<i>Solanum habrochaites</i>	ECU-675	Perú	Cajamarca	Cajamarca
	ECU-764	Perú	Cajamarca	Cajamarca
	ECU-888	Perú	Las Lomas	Piura
	ECU-911	Perú	Sicches	Piura
	ECU-926	Perú	Puesto fronterizo	Piura
	ECU-968	Perú	Quirivilca	La Libertad
<i>Solanum lycopersicoides</i>	CH-42/5	Chile	Arica	Tarapacá
	CH-50/1	Chile	Putre	Tarapacá
	CH-51/1	Chile	Putre	Tarapacá
<i>Solanum peruvianum</i>	CH-22/2	Chile	Molinos	Tarapacá
	ECU-0944	Ecuador	Loja	Azuay
	ECU-0953	Ecuador	Cuenca	Azuay
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	ECU-0877	Perú	La cienaguilla	Piura
	ECU-0878	Perú	Sinchi Roca	Piura
	ECU-0966	Perú	Santa	Ancash

Se utilizó como control susceptible la línea Uco Plata perteneciente a la especie *Solanum lycopersicum*. Dicha línea se seleccionó por su elevada susceptibilidad al PepMV demostrada en ensayos anteriores.

### 3.2. Germinación de las semillas

Las semillas de cada entrada se sumergieron en una solución de hipoclorito sódico (1,5%) durante 10 minutos. El objetivo de este tratamiento fue realizar una desinfección de la cubierta seminal y favorecer el proceso germinativo. Posteriormente se enjuagaron las semillas con agua destilada, se depositaron en placas Petri donde, previamente, se había colocado una capa de algodón hidrófilo y papel de filtro humedecido con agua destilada. El número aproximado de semillas sembradas por placa fue de 50, aunque en algunas entradas la cantidad disponible fue inferior. La diferente viabilidad germinativa de las entradas, así como la mortalidad post-nascencia, hizo que el número de plantas probadas por entrada fuera variable.

### 3.3. Condiciones de cultivo

Cuando las plántulas se encontraban en el estado de cotiledón desplegado se transplantaron a macetas de polietileno de 6 x 6 x 6 cm. con turba enriquecida. Las macetas se distribuyeron por entradas en bandejas de PVC de 35 x 24 cm. (figura 14). El riego se realizó manualmente mediante subirrigación aprovechando la capilaridad de la turba.

Estas bandejas se introdujeron en un fitotrón donde se procedió a la inoculación y se desarrolló el resto del ensayo. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

- Fotoperiodo: 16 h. luz/ 8h. oscuridad
- Temperatura: 25°C día / 18°C noche
- Humedad relativa ambiental: 60-65% día / 90-100% noche



**Figura 14:** Plantas a las dos semanas de su transplante.

### **3.4. Aislados**

Se utilizó el aislado LE-2002, obtenido originalmente de plantas sintomáticas de tomate colectadas en Murcia. Este aislado se ha mantenido en plantas susceptibles de las variedades Fortuna-C y NE-1 mediante renovación y análisis periódicos con la técnica “Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (DAS-ELISA), para comprobar su presencia y acumulación en planta.

### **3.5. Método de inoculación**

La preparación del inóculo se realizó a partir de tejido fresco procedente de plantas de tomate infectadas. Se trituró el material fresco infectado por PepMV en un mortero. La pasta obtenida se filtró a través de un tejido de muselina y se recogió el filtrado en un vaso de precipitados. El extracto obtenido se diluyó en agua destilada en una proporción 1:10 (peso:volumen), y se mantuvo en ambiente refrigerado para evitar la degradación del virus.

La inoculación de las plantas se realizó mecánicamente en el estado de cuatro hojas desarrolladas mediante un aplicador de algodón. El inóculo se distribuyó por toda la superficie foliar de las plantas a analizar. A los 15 días se repitió la inoculación para prevenir posibles escapes.

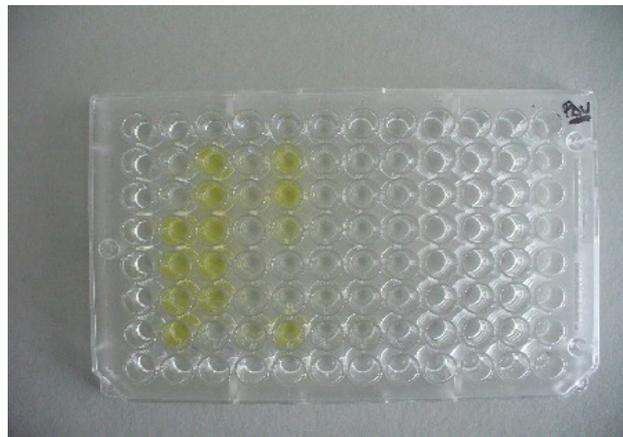
De cada entrada se mantuvieron controles sin inocular con el objeto de determinar adecuadamente los síntomas en las plantas inoculadas. Dichos controles se mantuvieron en bandejas separadas del resto, y se tuvo especial cuidado en la manipulación de dichas plantas con guantes estériles de látex para evitar su contaminación.

### **3.6. Seguimiento de la enfermedad**

#### **3.6.1. Análisis serológico de las muestras**

Se tomaron muestras de hoja apical no inoculada de cada planta a los 15, 30, 45 y 60 días de la fecha de la segunda inoculación (D.D.I.). Las muestras se analizaron mediante la técnica Double Antibody Sandwich-Enzyme linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA). Se siguió el protocolo de Clarck y Adams (1977), con modificaciones, según lo especificado por los proveedores de los anticuerpos (Loewe Biochemica® ); (ver protocolo en Anejo I.).

La absorbancia de la reacción DAS-ELISA se midió a 405 nm en un fotómetro Microplate Reader Model 550 (Biorad Laboratories®). El valor de absorbancia se consideró como una medida relativa de la acumulación viral (Kegler, 1992; Smith y Murakishi, 1993; Ding *et al.*,1995). Se consideró que la muestra era positiva, es decir, que había presencia de virus, cuando la absorbancia era mayor que la media de las absorbancias de las respectivas plantas control más tres veces su desviación típica. Para poder comparar la acumulación viral entre entradas, se calculó un índice de absorbancia ( I ) como cociente entre la absorbancia máxima media de una entrada y la absorbancia máxima media del control susceptible Uco Plata.



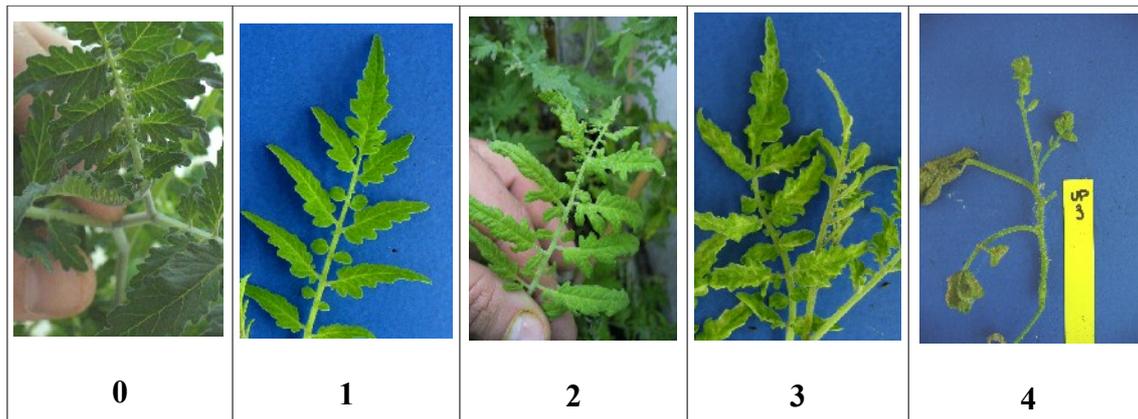
**Figura 15:** Detalle de una placa tras realizar la prueba DAS-ELISA con anticuerpos contra el PepMV.

### 3.6.2. Sintomatología

Paralelamente a la toma de muestras se anotaron los síntomas relacionados con la infección por PepMV que presentaba cada planta. Para cuantificar los síntomas se utilizó un índice que variaba entre 0 para una planta sin síntomas y 4 para una planta con síntomas severos o muerta (tabla 6; figura 16).

**Tabla 6:** Niveles de severidad considerados para los síntomas de PepMV.

NIVEL DE SEVERIDAD	DESCRIPCIÓN
0	Sin síntomas
1	Síntomas leves
2	Síntomas moderados
3	Síntomas graves
4	Síntomas muy graves o planta muerta



**Figura: 16:** Niveles de severidad de los síntomas causados por la infección de PepMV.

### **3.7. Comprobación de la resistencia de las plantas seleccionadas**

Las plantas que no presentaban infección sistémica a los 60 días después de la segunda inoculación (D.D.I.) fueron transplantadas a macetas de diámetro superior (14 cm.). El sustrato de cultivo consistió en turba enriquecida. El objetivo del transplante fue garantizar la supervivencia de la planta y permitir un seguimiento a largo plazo.

Con el fin de confirmar la resistencia se tomaron muestras a 90 D.D.I., y se procedió a su análisis serológico y evaluación de síntomas.

**RESULTADOS**  
**Y**  
**DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Cribado de entradas silvestres para la búsqueda de resistencias al PepMV

#### 4.1.1. Control susceptible

La línea Uco Plata presentó un 100% de plantas con infección sistémica y manifestación de síntomas severos (tabla 7 y 8). Estos consistieron en mosaicos, filimorfismo moderado de hojas y deformación de las mismas. El comportamiento susceptible de Uco Plata nos indica que las condiciones de inoculación fueron las adecuadas .

**Tabla 7.:** Respuesta de las entradas de *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicoides*, *S. peruvianum* y *S. pimpinellifolium* frente a la inoculación mecánica con PepMV I.

Entrada	Índice de síntomas <sup>1</sup> (DDI) <sup>3</sup>				Absorbancia media <sup>2</sup> (DDI)				PPIS <sup>4</sup> (DDI)				Acu. <sup>5</sup>
	15	30	45	60	15	30	45	60	15	30	45	60	
<i>S. chilense</i>													
CH-57/3	1,0	1,7	2,1	1,7	0,65	0,75	0,50	0,81	71,43	92,86	57,14	78,57	100,00
CH-62/5	0,0	0,3	0,5	0,6	0,74	0,58	0,29	0,36	81,25	56,25	50,00	62,50	81,25
LA-1963	0,6	0,8	1,3	2,6	0,08	0,51	0,67	1,03	0	100	100	100	100,00
LA-1971	0,3	0,9	1,2	1,6	0,47	0,41	0,55	0,71	91,83	4,08	95,74	95,65	95,91
LA-2762	0,5	0,8	1,4	1,7	0,09	0,42	0,69	0,76	0	100	100	100	100
PER-526	0,6	1,7	2,0	2,6	0,12	0,47	0,90	1,09	14,28	100	100	100	100
PER-527	0,5	0,7	1,7	2,2	0,21	0,46	0,50	0,77	38,46	61,53	66,67	72,72	76,92
PER-560	1,0	1,1	2,2	2,4	0,08	0,34	0,86	0,78	12,50	75,00	75,00	66,66	75,00
<i>S. habrochaites</i>													
ECU-675	0,5	0,7	1,3	1,9	0,18	0,49	0,90	0,44	41,93	100	100	100	100
ECU-764	0,4	0,1	0,1	0,2	1,21	0,59	1,74	1,57	100	100	100	100	100
ECU-888	0,4	1,0	1,6	2,0	0,41	0,52	0,71	0,99	66,67	100	100	100	100
ECU-911	0,5	0,8	1,3	1,7	0,61	0,51	0,65	0,63	42,30	90,19	76,47	100	100
ECU-926	0,2	0,4	0,8	1,4	1,27	0,33	0,26	0,57	48,27	100	51,72	100	100
ECU-968	0,3	0,6	0,8	1,7	0,34	0,20	0,37	1,16	69,69	33,33	87,5	100	100
<i>S. lycopersicoides</i>													
CH-42/5	0,0	0,0	0,0	0,5	1,31	0,30	0,32	0,88	80,00	80,00	40,00	80,00	100
CH-50/1	0,0	0,1	0,2	0,2	0,26	0,33	0,18	0,06	21,43	28,57	14,28	7,10	92,85
CH-51/1	0,0	0,0	0,6	0,7	0,26	0,56	0,17	0,04	22,72	36,36	27,27	13,63	77,27
<i>S. peruvianum</i>													
CH-22/2	0,7	0,7	0,9	1,3	1,05	0,99	0,50	0,71	100	100	90,90	68,18	100
ECU-944	1,2	1,9	3,3	3,2	0,12	0,54	0,77	0,87	0	100	100	100	100
ECU-953	1,9	2,5	2,6	2,9	0,38	0,77	1,13	0,99	70,96	96,77	100	100	100
<i>S. pimpinellifolium</i>													
ECU-0877	1,0	1,5	1,5	1,5	0,36	1,09	0,82	1,17	75,00	100	100	100	100
ECU-0878	1,1	1,6	1,9	2,3	0,35	0,65	0,76	0,72	62,96	96,15	96,15	100	100
ECU-0966	1,1	1,8	2,3	2,4	0,28	0,76	0,72	0,93	53,85	96,15	96,00	100	100
<i>S. lycopersicum</i>													
Uco Plata	1,4	1,5	2,2	2,4	1,04	0,87	0,66	0,99	100	100	100	100	100

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

2: Valor medio de la absorbancia de las plantas de una entrada.

3: Días después de la 2ª inoculación

4: Porcentaje de plantas sobre el total de la entrada que presentaban infección sistémica a los 15, 30, 45 y 60 DDI.

5: Porcentaje de plantas que han mostrado infección sistémica en al menos una de las fechas de muestreo.

**Tabla 8.** Respuesta de las entradas de *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicoides*, *S. peruvianum* y *S. pimpinellifolium* frente a la inoculación mecánica con PepMV II.

Entrada	Índice de síntomas máximo medio <sup>1</sup>	Abs. máxima media <sup>2</sup>	Índice de síntomas máximo medio de las plantas infectadas sistémicamente <sup>3</sup>	Abs media máxima de plantas infectadas sistémicamente <sup>4</sup>	Índice de absorbancia <sup>5</sup>
<i>S. chilense</i>					
CH-57/3	2,00	1,13	2,17	1,20	0,98
CH-62/5	0,80	0,86	0,79	1,06	0,86
LA-1963	2,58	0,90	2,58	0,90	0,74
LA-1971	1,68	0,73	1,74	0,75	0,61
LA-2762	1,75	0,88	1,75	0,88	0,72
PER-526	2,64	0,85	2,64	0,85	0,70
PER-527	2,15	0,76	2,20	0,96	0,79
PER-560	2,87	0,94	3,25	1,31	1,07
<i>S. habrochaites</i>					
ECU-675	1,93	0,90	1,93	0,90	0,74
ECU-764	0,55	1,74	0,39	1,93	1,58
ECU-888	2,04	1,00	2,04	1,00	0,82
ECU-911	1,80	1,17	1,80	1,17	0,96
ECU-926	1,41	1,33	1,41	1,33	1,09
ECU-968	1,78	0,81	1,78	0,81	0,66
<i>S. lycopersicoides</i>					
CH-42/5	0,70	1,31	0,50	1,60	1,31
CH-50/1	0,36	0,48	0,36	0,50	0,41
CH-51/1	0,73	0,58	1,15	0,65	0,53
<i>S. peruvianum</i>					
CH-22/2	1,18	1,28	1,18	1,28	1,05
ECU-0944	3,33	0,75	3,33	0,75	0,61
ECU-0953	3,06	1,16	3,06	1,16	0,95
<i>S. pimpinellifolium</i>					
ECU-0877	1,75	1,25	1,75	1,25	1,02
ECU-0878	2,30	0,89	2,30	0,89	0,73
ECU-0966	2,48	1,08	2,48	1,08	0,88
<i>S. lycopersicum</i>					
Uco Plata	2,27	1,22	2,27	1,22	1

1: Valor medio del índice de síntomas máximo de las plantas de cada entrada medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta)

2: Valor medio de las absorbancias máximas de las plantas de una entrada.

3: Valor medio del Índice de síntomas máximo de las plantas infectadas sistémicamente.

4: Valor medio de las absorbancias máximas de las plantas infectadas sistémicamente

#### 4.1.2. *Solanum chilense*

Las entradas de esta especie mostraron un comportamiento variable (tabla 7 y 8). Algunas entradas mostraron un cierto porcentaje de plantas sin infección sistémica (CH62/5, LA-1971, PER-527 y PER-560). En las demás, el porcentaje de plantas con infección sistémica fue del 100%. La manifestación de síntomas fue variable consistiendo la mayoría de las veces en filimorfismos y mosaicos leves en hoja (figura 17 y 18). El mejor comportamiento correspondió a la entrada LA-1971 que mostró uno de los menores índices de síntomas y la menor acumulación viral. Las entradas CH-62/5 y PER-527 fueron las que presentaron el mayor número de plantas resistentes (tabla 9).



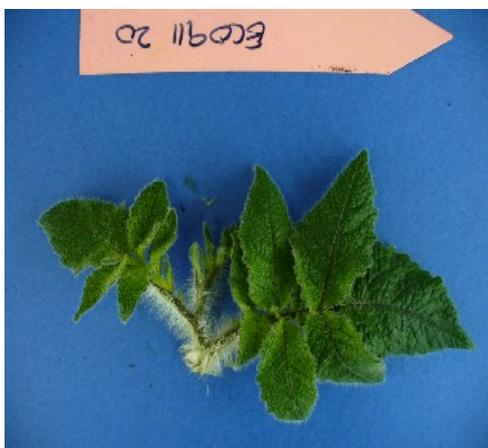
**Figura 17:** Zona apical de una planta de la entrada PER-560 de *S. chilense* sin manifestación clara de síntomas.



**Figura 18:** Zona apical de una planta claramente sintomática de la entrada LA1971 de *S. chilense*.

#### 4.1.3. *Solanum habrochaites*

Todas las entradas de *S. habrochaites* mostraron un 100% de plantas con infección sistémica (tablas 7 y 8). Los síntomas consistieron en leves filimorfismos y mosaicos en hojas (figura 20).



**Figura 19:** Zona apical de planta de *S. habrochaites* asintomática.



**Figura 20:** Detalle de mosaico en *S. habrochaites* por infección de PepMV.

Las acumulaciones virales en las entradas de *S. habrochaites* fueron variables, pero siempre con índices de absorbancia mayores de 0,65. Sin embargo, la entrada ECU-764, todo y tener la mayor acumulación viral de todas las entradas probadas en este trabajo, y presentar síntomas claros de la enfermedad a los 15 DDI, a partir de esta fecha éstos desaparecieron completamente. Este comportamiento parece indicar la existencia de tolerancia al PepMV en esta entrada. Este hecho es muy prometedor para

el desarrollo futuro de variedades de tomate tolerantes al PepMV. Con anterioridad, otros autores habían citado la existencia de apreciables niveles de resistencia al PepMV en la especie *S. habrochaites* (Ling, 2007). Sería necesario realizar ensayos en condiciones de cultivo comercial para determinar si esta tolerancia permite obviar el manchado de frutos, sobre todo cuando sea transferida al fondo genético del tomate cultivado.

#### 4.1.4. *Solanum lycopersicoides*

El comportamiento de las entradas de *S. lycopersicoides* fue variable (tabla 7 y 8; figura 21). Una de ellas (CH-42/5) mostró un 100% de plantas con infección sistémica. Sin embargo, dos de ellas (CH-50-1 y CH-51-1) mostraron porcentajes variables de plantas resistentes y las plantas con infección sistémica mostraron las acumulaciones virales más bajas de todas las entradas probadas en este trabajo (tabla 8). La detección de plantas resistentes en la especie *S. lycopersicoides* es muy prometedora para el desarrollo de variedades comerciales de tomate resistentes al PepMV, teniendo en cuenta que ya se ha conseguido cruzar *S. lycopersicoides* con el tomate cultivado (Chetelat *et al.*, 1997).



**Figura 21:** Detalle de la zona apical de dos plantas de la entrada CH50/1.

#### 4.1.5. *Solanum peruvianum*

Las tres entradas de *S. peruvianum* mostraron un 100% de plantas con infección sistémica (tabla 7). Una de ellas mostró síntomas asociados a la enfermedad entre leves y moderados y las otras dos síntomas severos (tabla 7 y 8; figura 22). La acumulación viral fue variable, pero en todos los mayor del 60% de la correspondiente al control

susceptible. En anteriores trabajos ya había sido citada la falta de resistencias en la especie *S. peruvianum* (Soler *et al.*, 2007; Ling, 2007).



**Figura 22:** Síntomas severos producidos por PepMV en una planta de *S. peruvianum*.



**Figura 23:** Síntomas severos en planta de la entrada ECU-877 de *S. pimpinellifolium*.

#### 4.1.6. *Solanum pimpinellifolium*

Las tres entradas de la especie *S. pimpinellifolium* mostraron un 100% de plantas susceptibles, expresión de síntomas entre moderados y severos, y elevadas acumulaciones virales (tabla 7 y 8; figura 23). La susceptibilidad de esta especie frente a la inoculación mecánica con PepMV ya había sido citada con anterioridad (Soler *et al.*, 2007).

### 4.2 Comprobación de la resistencia de las plantas seleccionadas

El seguimiento de las plantas seleccionadas como resistentes en las entradas CH-62-5, LA-1971, PER-527 y PER-560 de *S. chilense*, y CH-50-1 y CH-51-1 de *S. lycopersicoides* mostró unos resultados variables (tabla 9). Mientras que las selecciones de CH-62-5, LA-1971 y PER-560 continuaron mostrándose resistentes a los 90 DDI, 1, 1 y 3 plantas de las entradas PER-560, CH-50-1 y CH-51-1 respectivamente, presentaron infección sistémica por PepMV en esta misma fecha. Por tanto, podemos decir que la entrada CH-50-1 muestra un 100% de plantas con infección sistémica y queda clasificada como susceptible. El resto de entradas parecen segregarse para una posible resistencia al PepMV. Las plantas seleccionadas y confirmadas como resistentes serán pasadas a campo para obtener descendencia y determinar su comportamiento frente a la inoculación mecánica con PepMV.

**Tabla 9:** Seguimiento de las entradas frente a la inoculación mecánica con PepMV.

Entrada	Nº plantas seleccionadas a 60 DDI <sup>1</sup>	Nº Plantas infectadas o muertas a 90 DDI	PPIS <sup>2</sup> acumulado a 60 DDI	PPIS <sup>3</sup> acumulado a 90 DDI
<i>S. chilense</i>				
CH-57/3	0	---	100	100
CH-62/5	3	0	81,25	81,25
LA-1963	0	---	100	100
LA-1971	2	0	95,91	95,91
LA-2762	0	---	100	100
PER-526	0	---	100	100
PER-527	3	1	76,92	84,61
PER-560	2	0	75,00	75,00
<i>S. habrochaïtes</i>				
ECU-675	0	0	100	100
ECU-764	0	0	100	100
ECU-911	0	---	100	100
ECU-926	0	---	100	100
ECU-968	0	---	100	100
ECU-888	0	---	100	100
<i>S. lycopersicoides</i>				
CH-42/5	0	---	100	100
CH-50/1	1	1	92,85	100
CH-51/1	5	3	77,27	90,90
<i>S. peruvianum</i>				
CH-22/2	0	---	100	100
ECU-944	0	---	100	100
ECU-953	0	---	100	100
<i>S. pimpinellifolium</i>				
ECU-877	0	---	100	100
ECU-878	0	---	100	100
ECU-966	0	---	100	100
<i>S. lycopersicum</i>				
Uco Plata	0	---	100	100

1: Días después de la segunda inoculación.

2: Porcentaje de plantas de la entrada que presentaban o habían presentado infección sistémica hasta los 60 DDI.

3: Porcentaje de plantas de la entrada que presentaban o habían presentado infección sistémica hasta los 90 DDI.

## **CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

1.- Todas las entradas de *S. peruvianum* y *S. pimpinellifolium* fueron clasificadas como susceptibles frente a la inoculación mecánica con PepMV en nuestras condiciones experimentales. Es decir, presentaron un 100% de plantas con infección sistémica, síntomas claros de la enfermedad causada por el PepMV y elevadas acumulaciones virales en la mayoría de los casos.

2.- Todas las entradas de *S. habrochaites* presentaron un 100% de plantas con infección sistémica y elevadas acumulaciones virales. En todas se observaron síntomas asociados a la enfermedad. Sin embargo, en la entrada ECU-764, estos fueron muy leves a los 15 DDI y desaparecieron con posterioridad. Esta entrada parece mostrar, por tanto, una tolerancia al PepMV y podría ser prometedora como fuente de resistencia.

3.- Las entradas de *S. chilense* han mostrado un comportamiento variable. Ha sido posible seleccionar plantas resistentes de las entradas CH-62-5, LA-1971, PER-527 y PER-560. Es de interés proceder a obtener descendencia de estas plantas y determinar su comportamiento frente a la inoculación mecánica con PepMV.

4.- Las entradas de *S. lycopersicoides* han mostrado también un comportamiento variable. En dos de ellas ha sido posible seleccionar plantas resistentes, cuya descendencia será motivo de estudio al igual que en el caso de *S. chilense*.

5.- Los resultados obtenidos en este trabajo confirman las especies *S. chilense*, *S. habrochaites* y *S. lycopersicoides* como las más prometedoras para la búsqueda de fuentes de resistencia al PepMV.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**Aguilar, J.M., Hernandez, G., Cenis, J.I., Lacasa, A., Aranda, M.A.** 2002. Complete sequence of the *Pepino mosaic virus* RNA genome. Archives of Virology 147(10): 2009-2015.

**Ayuso, M.C., Nuez, F., Cuartero, J.** 1986. Nuevas posibilidades en el aprovechamiento de *Lycopersicon peruvianum* en la mejora del tomate. II Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas: 1215-1223.

**Buck, A., Stijger, C.M.** 2002. Yield loss by pepino mosaic virus in Dutch: Schade door pepinomozaïekvirus. PPO Publicatie nr. 539 PPO Glastuinbouw Naaldwijk.

**Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J. Gibbs, A.J., Watson, L., Zurcher, E.J.** 2003. Viruses of plants. Descriptions and list from the VIDE Database. CAB internacional. Wallingford, Reino Unido . [Http://www.biology.anu.edu.au/](http://www.biology.anu.edu.au/).

**Chetelat, R.T., P. Cisneros, L. Stamova, and C.M. Rick.** 1997. A male-fertile *Lycopersicon esculentum* x *Solanum lycopersicoides* hybrid enables direct backcrossing to tomato at the diploid level. Euphytica 95: 99-108.

**Clark, M.F., Adams, A.N.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-483.

**Córdoba, M.C., Martínez-Priego, L.L., Jordá, C., Lacasa, A.** 2002. Avances en el estudio del comportamiento del Pepino Mosaic virus. XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología: 107.

**Córdoba, M.C., Martínez-Priego, L., Jordá, C.** 2004. New natural hosts of *Pepino mosaic virus* in Spain. Plant Disease 88: 906.

**Córdoba, M.C., García-Rández, A., Alfaro-Fernández, A., Jordá, C.** 2007. Seed transmission of *Pepino Mosaic Virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments. Plant Disease 91: 1250-1254.

**Cotillon, A.C., Girard, M., Ducouret, S.** 2002. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of *Pepino mosaic virus* (PepMV). Archives of Virology 147: 2231-2238.

**Davino, S., Accotto, G.P., Masenga, V., Torta, L., Davino, M.** 2009. Basil (*Ocimum basilicum*), a new host of Pepino Mosaic Virus. Plant Pathology 58: 407.

**E.P.P.O.** 2003a. New pest situations-Pepino mosaic potexvirus. EPPO Working Party on Phytosanitary Regulations. Document 03/10351.

**E.P.P.O.** 2003b. *Pepino mosaic potexvirus*. EPPO Alert list. [http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert\\_List/viruses/PEPMV0.htm/](http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/viruses/PEPMV0.htm/).

**E.P.P.O.** 2003c. Situation of Pepino Mosaic Potexvirus in EPPO countries. Reporting Service 9: 132.

- E.P.P.O.** 2005. Pepino mosaic potexvirus occurs in Chile. *EPPO Reporting Service* 9: 144.
- E.P.P.O.** 2007. Regulated plant pest, detection. EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization. [Http: www.agric.org/pmp/2007/](http://www.agric.org/pmp/2007/).
- Escrig Cancio, B.** 2002. Estudio de la transmisión del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) en tomate y búsqueda de fuentes de resistencia en el género *Lycopersicon*. Trabajo final de carrera de la Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Fakhro, A., Paschek, U., Von Barga, S., Büttner, C., Schwartz, D.** 2005. Distribution and spread of *Pepino mosaic virus* (PepMV) in tomatoes cultivated in a recirculating hydroponic system. En: Alford DV, Backhaus GF, eds. *Introduction and Spread of Invasive Species. Symposium Proceedings* 81.
- FAO.** 2007. FAOSTAT. Base de datos agraria. <http://faostat.fao.org/>.
- Finlay, K.W.** 1953. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato. II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. *Australian Journal of Biological Sciences* 6: 153-163.
- French, C.J., Bouthillier, M., Bernardy, M., Ferguson, G., Sabourin, Johnson, R.C., Masters, C., Godkin, S., Mumford, R.** 2001. First report of Pepino mosaic virus in Canada and the United States. *Plant Disease* 85 (10): 1121.
- Gómez, P., Sempere, R.N., Elena, S.F., Aranda, M.A.** 2009. Mixed infections of *Pepino mosaic virus* strains modulate the evolutionary dynamics of this emergent virus. *Journal of Virology* 83(23): 12378-12387.
- Hall, T.J.** 1980. Resistance at the Tm-2 locus in the tomato to *Tomato mosaic virus*. *Euphytica* 29: 189-197.
- Hansen I.M., Thomma, P.H.J.** 2009. Pepino Mosaic Virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular Plant Pathology*. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2009.00600.X.
- Hogenboom, N.G.** 1993. Economic importance of breeding for disease resistance. En: Jacobs, T. y Parlevliet, J.E., (editores). *Durability of Disease Resistance*: 5-9.
- Jones, R.A.C., Koenig, R., Lesemann, D.E.** 1980. Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology* 94: 61-68.
- Jones DR, Lammers W.** 2005. Pest risk analysis for *Pepino Mosaic Virus*. [www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/pepino.pdf](http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/pepino.pdf).
- Jordá, C., Lázaro, A., Font, I., Lacasa, A., Guerrero, M.M., Cano, A.** 2000. Nueva enfermedad en el tomate. *Phytoma-España* 119: 23-28.

- Jordá, C., Lázaro Pérez, A., Martínez, P.V. and Lacasa, A.** 2001. First report of *Pepino mosaic virus* on natural hosts. *Plant Disease* 85: 1292.
- Krinkels, M.** 2001. *Pepino Mosaic virus* causes sticky problem. *Prophyta: The Annual*, May 2001: 30-33.
- Lacasa, A., Guerrero, M.M., Hita, I., Martínez, M .A., Hernández, M.D.** 2001. La diseminación del virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino Mosaic Virus*) en las labores de entutorado y desbrotado de las plantas de tomate. *Bol. San. Veg. Plagas* 27: 489-501.
- Lacasa, A., Guerrero, M.M., Hita, I., Martínez, M.A., Jordá, C., Bielza, P., Contreras, J., Alcazar, A., Cano, A.** 2003. Implication of bumble bees (*Bombus* spp.) on *Pepino mosaic virus* (PepMV) spread on tomato crops. *Plagas* 29: 393-403.
- Lesemann, DE., Dalchow, J., Winter, S., Pfeilstetter, E.** 2000. Occurrence of *Pepino mosaic virus* in European tomato crops: identification, etiology and epidemiology. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt* 376: 323.
- Ling, K.** 2008. *Pepino mosaic virus* on tomato seed: virus location and mechanical transmission. *Plant Disease* 92: 1701-1705.
- Ling, K., Scott, J.W.** 2007a. Sources of resistance to *Pepino mosaic virus* in *Solanum habrochaites* (*Lycopersicon hirsutum*). [Http://www.ces.ncsu.edu/fletcher/programs/plantpath/2006-11-tomato-disease/index.html/](http://www.ces.ncsu.edu/fletcher/programs/plantpath/2006-11-tomato-disease/index.html/).
- Ling, K.** 2007b. Molecular characterization of two *Pepino mosaic virus* isolates from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes* 34: 1-8.
- Marchoux, G., Gebre, S.K., Gognalons, P.** 2001. Three factors contribute to the emergence of a new viruses: i.e. adaptative evolution, intensification and globalization. Tomato and pepper crops as examples. *Phytoma* 541: 40-45.
- MARM.** 2008. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos (ESYRCE). <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/encuestacultivos/resultados.htm>
- Maroon-Lango, C., Guaragna, M.A., Jordan, R.L., Bandia, M., Marquardt, S.** 2003. Detection and characterization of a US isolate of *Pepino mosaic virus*. *Phytopathology* 93(6): S57.
- Martin-Bretones, G., Velasco, L., Segundo, E., Cansen, D., Riuz Garcias, L., Cano, M., Cuadrado, I.M.** 2002. Presencia de *Pepino dulce mosaic virus* en Almeria: variabilidad y diagnostico mediante sondas RNA. XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología: 95.
- Mumford, R.A., Metcalfe, E.J.** 2001. The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology* 146: 2455-2460.

- Nuez, F., Rodríguez del Rincón, A.** 1995. Ed. Mundi-Prensa. El cultivo del tomate.
- O'Neill, T., Spence, N., Mumford, R., Skelton, A.** 2003. *Pepino mosaic virus* of tomato – new results on virus persistence and disinfection. Factsheet 20/03, Tomato, Project No. PC 181, Horticultural Development Council, East Malling, Kent, UK.
- Parrella, G., Laterrot, H., Selassie, K.G., Marchoux, G.** 1998. Inheritance of resistance to *Alfalfa mosaic virus* in *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* PI 134417. *Journal-of-Plant-Pathology* 80: 3, 241-243.
- Parrella, G., Ruffel, S., Moretti, A., Morel, C., Palloix, A., Caranta, C.** 2002. Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 6-7, 855-861.
- Picó, B., Díez, M.J., Nuez, F.** 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *Tomato yellow leaf curl virus* – a review. *Scientia Horticulturae* 67(3): 151-196.
- Pfeilstetter, E.** 2003. Monitoring zum Auftreten von *Pepino mosaic virus* in Deutschland. Letter to the European Commission, 2 Oktober 2003. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft.
- Pospeiszny, H., Borodynko, N. Palczewska, M.** 2002. Occurrence of *Pepino mosaic virus* in Poland. *Phytopathologia Polonica* 26: 91-94.
- Rick, C.M.** 1978. Evolution of interspecific barriers in *Lycopersicon*. Proceedings of the Conference on Broadening Genetic Base Crops. Wageningen. Pudoc.
- Rick, C.M.** 1979a. Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species in *Solanum*. En: Hawkes, J. G.; Lester, R. N.; Skelding, A. D. (eds). *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*.
- Rick, C.M.** 1979b. Potential improvement of tomatoes by controlled introgression of genes from wild species.. In: AC. Zeven, and M. A. Harten (eds.). Proceedings of the Conference on Broadening Genetic Base Crops. Pudoc, Wageningen, Netherlands: 67-173.
- Rick, C.M.** 1980. Tomato. En: Fehr, W.R. Y Hadley, H.H.(eds). *Hybridization of crop plants*.
- Roselló, S., Díez, M.J., Nuez, F.** 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The tomato spotted wilt virus – a review. *Scientia horticulturae*. (67), 3-4:117-150.
- Roggero, P., Masenga, V., Lenzi, R., Coghe, F., Ena, S., Winter, S.** 2001. First report of *Pepino mosaic virus* (Potyvirus) on tomato in Italy. *Plant Pathology* 50 (6): 798.

- Salomone, A., Roggero, P.** 2002. Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Plant Pathology* 84: 65-68.
- Shipp, J.L., Buitenhuis, R., Stobbs, L., Wang, K., Kim, W.S., Fergusson, G.** 2008. Vectoring of *Pepino Mosaic Virus* by bumble-bees in tomato greenhouses. *Annals of Applied Biology* 53: 149-155.
- Soler, S., Cebolla-Cornejo, J., Prohens, J. and Nuez, F.** 2000a. El *Pepino mosaic virus* (PepMV), una nueva amenaza para el cultivo del tomate (I). *Vida Rural* 120: 42-44.
- Soler, S., Cebolla-Cornejo, J., Prohens, J., Nuez, F.** 2000b. El *Pepino mosaic virus* (PepMV), una nueva amenaza para el cultivo del tomate ( y II). *Vida Rural* 119: 48-52.
- Soler, S., Prohens, J., Diez, M.J. Nuez, F.** 2002. Natural occurrence of *Pepino mosaic virus* in *Lycopersicon* species in Central and Southern Peru. *Journal of Phytopathology* 150 (2): 49-53.
- Soler, S., Lopez C., Diez, M.J., de Castro, A.P., Nuez, F.** 2005. Association of *Pepino mosaic virus* with tomato collapse. *Journal of Phytopathology* 153: 464-469.
- Soler, S., Cebolla-Cornejo, J., Nuez, F.** 2007. Sources of resistance to *Pepino mosaic virus* (PepMV) in tomato. *HortScience* 42: 40-45
- Spence, N.J, Basham, J., Mumford, R.A., Hayman, G., Edmondson, R., Jones, D.R.** 2006. Effect of *Pepino mosaic virus* on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology* 55: 595-606.
- Stevens, M.R., Lamb, E.M., Rhoads, D.D.** 1995. Mapping the *Sw-5* locus for *Tomato spotted wilt virus* resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 3-4, 451-456.
- Stijger, I.** 2002. Controlling *Pepino Mosaic Virus* in Tomato. Canadian Greenhouse Conference. [Http://www.canadiangreenhouseconference.com/Ftalks/2002/2002-Stijger.pdf/](http://www.canadiangreenhouseconference.com/Ftalks/2002/2002-Stijger.pdf/).
- Van der Vlugt, R.A.A., Stijger, C.M., Naaldwijk, A.A., Verhoeven, J.T.J., Lesemann, D.E.** 2000. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato. *Plant Disease* 84: 103.
- Van der Vlugt, R.A.A., Cuperus, C., Vink, J., Stijger, C.M., Lesemann, D.E., Verhoeven, J.T.J. and Roenhorst, J.W.** 2002. Identification and characterization of *Pepino mosaic potexvirus* in tomato. *OEPP/EPPO Bulletin* 32: 503-508.
- Verhoeven, J.T.J., Van der Vlugt, R.A.A., Roenhorst, J.W.** 2003. High similarity between isolates of pepino mosaic virus suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology* 109: 419-425.

**Wright, D., Mumford, R.** 1999. *Pepino Mosaic Potexvirus* (PepMV): First Records in Tomato in the United Kingdom. Plant Disease Notice 89. Central Science Laboratory. York.

**Young, N.D., Tanksley, S.D.** 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theoretical-and-Applied-Genetics* 77: 3, 353-359.

# **ANEJOS**

## **ANEJO I: Protocolo DAS-ELISA**

### **Protocolo DAS-ELISA para PepMV**

**Anticuerpo:** AS-0554 IgG

Se realizan los siguientes pasos:

#### **1. Recubrimiento**

Se disuelve el anticuerpo AS-0554 IgG en tampón de recubrimiento (dilución 1:1000). Se llena cada pocillo de una placa de microtitulación para análisis con 100 µl 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 °C.

#### **2. Lavado**

Se vacían las placas y se elimina el exceso de reactivo de recubrimiento realizando 4 lavados con 200 µl de tampón de lavado por pocillo. Los dos primeros lavados son rápidos (no se deja reposar el tampón de lavado) y en los dos siguientes se deja reposar 3 minutos en los pocillos. Este paso se realiza manualmente.

#### **3. Formación de antígeno-anticuerpo**

Las muestras a analizar y los correspondientes controles (positivo y negativo) se trituran y se diluyen en tampón de extracción 1:20 (p:v). Se distribuyen en las placas a razón de 100 µl por pocillo (6ml/placa). En cada placa, en uno de los pocillos se sitúa un blanco (tampón de extracción). Se llenan los pocillos de los bordes con agua destilada. Se tapa la placa y se incuba un mínimo de 12 horas en frigorífico a 4°C.

#### **4. Lavado**

Se vacían las placas y se lavan de la forma indicada en el punto 2, pero realizando 5 lavados, siendo los dos últimos en los que debe mantenerse el tampón de lavado 3 minutos en los pocillos.

## 5. Reacción con el conjugado-anticuerpo-FA

Diluir a 1:1000 el anticuerpo AS-0554 IgG conjugado con el enzima fosfatasa alcalina (IgG-FA) en tampón de extracción y llenar los pocillos con 100 µl de esta solución (6 µl /placa). Llenar los pocillos de los bordes con agua destilada para evitar el efecto borde, tapar firmemente y dejar incubar en estufa durante 4 horas.

## 6. Lavado

Se vacían las placas y se realizan 5 lavados de la misma forma que en el paso 4.

## 7. 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 de esta solución (6ml/placa). Se incuba la placa durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se detiene la reacción con 50 µl por pocillo de NaOH 3N.

Realizar la lectura de la absorbancia a 405 nm fotómetro Microplate Reader Model 550.

## Composición de los tampones DAS-ELISA

Para la realización de la técnica serológica DAS-ELISA se utilizan diferentes tampones, siendo su composición la siguiente:

### Tampón de recubrimiento:

- 1,59 g·l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 2,93 g·l<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>
- 0,20 g·l<sup>-1</sup> de NaN<sub>3</sub>
- Ajustar pH a 9,6

### Tampón de lavado:

- 8 g·l<sup>-1</sup> de NaCl
- 2,9 g·l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O
- 0,2 g·l<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0,2 g·l<sup>-1</sup> de KCl
- 0,2 g·l<sup>-1</sup> de NaN<sub>3</sub>
- 0,5 ml·l<sup>-1</sup> 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:

- 20 g·l<sup>-1</sup> de Polyvinil Pirrolidina (viscosidad K10-K40)
- 2 g·l<sup>-1</sup> de Albumina de suero bovina

**Tampón substrato:**

- 97 ml·l<sup>-1</sup> de Dietanolamino
- 0,2 g·l<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> \* 12 H<sub>2</sub>O
- 0,2 g·l<sup>-1</sup> de NaN<sub>3</sub>
- Ajustar pH a 9,8

**ANEJO II: RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DEL TRABAJO FIN DE MASTER.**

**Ensayo 1: Cribado de entradas silvestres para la búsqueda de resistencias al PepMV**

**Tabla 1.1:** Respuesta de la entrada Uco Plata (control susceptible) de *S. lycopersicum* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	1	0,5	0,5	1	1,395	1,262	0,513	1,249
2	0,5	0,5	0,5	0,5	1,393	1,367	0,541	1,454
3	1	1	0,5	1,5	1,393	1,379	0,259	0,568
4	0,5	1	1	1,5	1,531	1,486	0,339	0,513
5	1	0,5	1	1	1,598	1,097	0,428	0,928
6	0,5	0,5	0,5	1,5	1,777	1,469	0,479	1,008
7	0,5	0,5	0,5	1	1,606	1,53	0,133	1,140
9	0,5	0,5	0,5	1	1,466	1,381	0,246	0,718
10	0,5	0,5	0,5	0,5	1,637	1,436	0,251	0,268
11	1	0,5	1	1,5	1,543	1,416	0,356	0,488
12	1	1	0,5	1	1,593	1,318	0,422	0,835
13	1	1,5	1	1	1,684	1,413	0,534	0,921
14	1	0,5	2	2,5	1,312	0,162	1,051	1,307
15	1,5	1,5	2	2	1,482	0,586	0,663	1,340
16	1,5	1,5	2,5	2,5	1,358	0,225	0,437	1,436
17	1,5	2	2,5	3	1,360	0,301	0,837	1,344
18	1	1	2	2	1,438	0,469	1,031	1,354
19	0,5	1,5	2	2,5	1,442	0,180	1,091	1,399
20	0,5	1,5	2,5	3	1,354	0,183	0,525	1,342
21	0,5	1	2	2,5	1,385	0,266	0,954	1,423
22	0,5	1	2,5	3	1,482	0,261	0,993	1,320
23	0,5	1	1,5	2	1,742	0,469	1,027	1,441
24	0,5	1,5	2	2	1,650	0,441	1,001	1,405
25	1,5	2	3,5	3	0,495	1,111	0,805	0,833
26	2	2	4	4	0,653	0,757	M	M
27	2	2	2	2,5	0,584	0,780	0,631	0,685
28	3	3	3,5	3	0,673	0,840	0,708	0,915
29	1,5	2	2	3	0,583	1,086	0,725	1,029
30	2	2	2,5	3	0,551	0,803	0,608	0,931

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

M: Planta muerta

**Tabla 1.2:** Respuesta de la entrada CH-57/3 de *S. chilense* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	3	2	0	1,060	1,486	0,152	0,161
2	0	0	0	0	0,078	0,963	0,044	-0,028
3	1	1	1,5	0	0,082	0,513	0,038	-0,034
4	2	3,5	2	2,5	1,153	1,249	0,430	0,925
5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,609	0,890	0,164	0,597
6	1	3	2	2,5	0,929	1,101	0,114	0,645
7	1	1	1,5	2	1,454	0,261	0,104	1,380
8	1	1	3	3	0,338	1,030	1,306	1,217
9	0	0,5	0,5	0	1,434	0,253	0,449	1,115
10	0	0	0	0	1,216	0,431	0,206	1,138
11	1	1	2	2	0,335	0,178	1,111	1,102
12	0,5	0,5	0,5	1	0,122	0,927	0,963	0,987
13	1	3,5	3,5	3	0,061	0,792	0,711	0,850
14	1	3	3	3	0,314	0,490	1,287	1,35

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

**Tabla 1.3:** Respuesta de la entrada CH-62/5 de *S. chilense* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0,5	0,5	0,5	1	0,051	0,030	0,044	0,029
2	0,5	1	1	1	-0,018	0,027	0,023	0,051
3	0	0	0,5	0,5	1,051	1,152	0,398	0,194
4	0	0,5	1	1,5	0,815	1,350	0,449	0,190
5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,693	1,085	0,187	0,104
6	0	1	1	0,5	1,291	1,177	0,228	1,032
7	0	0	0	0,5	0,041	0,198	0,034	0,030
8	0	0	0	2	0,649	0,725	0,158	0,732
9	0	0,5	0,5	0,5	0,608	0,845	0,217	0,383
10	0	0,5	0,5	0	0,599	0,665	0,275	0,105
11	0	0	0	0	0,725	0,914	0,127	0,134
12	0	1	1,5	1	1,252	0,190	1,303	1,260
13	0	0,5	1	0,5	1,217	0,186	0,809	0,963
14	0	0	0,5	0	1,165	0,057	0,128	0,066
15	0	0	1	1	1,080	0,081	0,064	0,073
16	0,5	1	2	2	1,385	0,481	1,122	1,401

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación

**Tabla 1.4:** Respuesta de la entrada LA-1963 de *S. chilense* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	1	1	1	1,5	0,065	0,539	0,780	1,240
2	0,5	0,5	1	2	0,072	0,508	0,770	1,092
3	0,5	0,5	1,5	4	0,100	0,564	0,587	M
4	0,5	0,5	1,5	4	0,114	0,585	0,736	M
5	0,5	1	1,5	2	0,078	0,467	0,610	0,868

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta

**Tabla 1.5:** Respuesta de la entrada LA-1971 de *S. chilense* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	0,5	0,5	0,5	0,463	0,104	0,498	0,604
2	0	0,5	1,5	1	0,513	0,070	0,528	0,761
3	0	0,5	0,5	1	0,564	0,076	0,575	0,640
4	0,5	0,5	1	1,5	0,484	0,150	0,539	0,613
5	0	0,5	0,5	1	0,786	0,085	0,566	0,998
6	0	1	0	0,5	0,414	0,086	0,426	0,567
7	0	1	0	0,5	0,452	0,086	0,463	0,815
8	0	0,5	1	1	0,466	0,059	0,398	0,652
9	0	2	2	4	0,498	0,139	0,688	M
10	0	1,5	1,5	1,5	0,479	0,148	0,550	0,644
11	0	1	1,5	1	0,419	0,115	0,478	0,698
12	0	1	0	1,5	0,458	0,132	0,630	0,666
13	0	0,5	0,5	2	0,306	0,129	0,542	0,584
14	0	1	2	2,5	0,451	0,062	0,275	0,730
15	0	0,5	0,5	1	0,499	0,112	0,562	0,866
16	0,5	1,5	1,5	1,5	0,408	0,110	0,642	0,654
17	0	0	0	0	0,485	0,053	0,339	0,490
18	0	1	1	2,5	0,453	0,088	0,659	0,653
19	0	1	0,5	0,5	0,463	0,084	0,526	0,601
20	0	0	0	0	0,018	0,002	-0,049	0,075
21	0	1	1,5	1	0,421	0,090	0,425	0,518
22	0	0,5	0,5	0,5	0,483	0,055	0,433	0,606
23	0	0,5	1	1	0,306	0,114	0,569	0,827
24	1,5	2	2,5	3,5	0,600	0,200	0,653	0,807
25	0,5	1,5	2	2,5	0,613	0,120	0,450	0,699
26	0	2	2	2	0,495	0,182	0,491	0,615
27	0,5	0,5	1	2,5	0,520	0,132	0,548	0,577
28	0	0,5	1	1	0,499	0,096	0,556	0,719
29	0	0,5	0,5	0,5	0,397	0,145	0,640	0,795
30	0	1	1	1	0,490	0,093	0,638	0,684
31	0,5	0,5	0,5	0,5	0,016	-0,006	0,022	0,015
32	0	0,5	0,5	0,5	0,632	0,134	0,535	0,580
33	0,5	0,5	1	1,5	0,566	0,133	0,590	0,699
34	0,5	1	1,5	1	0,555	0,106	0,626	1,158
35	0,5	1	2	2	0,004	0,184	0,565	0,898
36	1	0,5	1	4	0,324	0,067	0,463	M
37	1	1,5	1	1	0,558	0,104	0,572	0,751
38	0,5	1	1	2	0,603	0,106	0,796	0,775
39	1	1	1	1	0,537	0,194	0,871	0,555
40	0,5	1,5	2	2	0,587	0,135	0,748	0,809
41	0,5	1	1	2	0,809	0,187	0,697	0,804
42	2	2	4	4	0,672	0,110	M	M
43	0	1	1,5	2,5	0,720	0,137	0,656	1,192
44	0	1	1	2	0,698	0,168	0,618	0,933
45	0	1,5	1,5	2	0,211	0,116	0,632	0,921
46	1,5	2	2	3,5	0,535	0,184	0,842	1,239
47	0,5	1	1,5	2	0,616	0,117	0,594	1,145
48	1	1	1	1	0,134	0,469	0,886	0,525
49	0,5	2	4	4	0,569	1,120	M	M

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta

**Tabla 1.6:** Respuesta de la entrada LA-2762 de *S. chilense* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0,5	0,5	2	2	0,143	0,554	0,832	0,786
2	0,5	0,5	1	0,5	0,085	0,329	0,562	0,565
3	0	0,5	0,5	2	0,033	0,280	0,828	0,415
4	1,5	1,5	1,5	1,5	0,115	0,563	0,956	1,400
5	0,5	1,5	2	2	0,006	0,263	0,514	0,456
6	0,5	2	2,5	2,5	0,108	0,405	0,585	0,579
7	0,5	0,5	1,5	1,5	0,185	0,521	1,043	0,604

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

**Tabla 1.7:** Respuesta de la entrada PER-526 de *S. chilense* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

N° Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	0,5	1	1	0,106	0,386	0,583	0,667
2	0	4	4	4	0,201	M	M	M
3	0,5	1,5	0,5	1	0,183	0,335	0,573	0,720
4	1,5	4	4	4	0,002	M	M	M
5	0,5	1	1	4	0,128	0,530	1,419	M
6	1	1	1,5	2	0,161	0,662	1,317	1,732
7	1	1	1,5	2	0,083	0,471	0,621	1,238

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada.

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta

**Tabla 1.8:** Respuesta de la entrada PER-527 de *S. chilense* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

N° Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	0	0,5	0,5	0,069	0,341	0,676	0,331
2	0,5	0,5	1	2	-0,003	0,043	0,829	1,115
3	1	0,5	1,5	2,5	0,065	0,042	0,018	0,342
4	0	0,5	1,5	2	0,564	0,716	0,632	1,404
5	0	0,5	1,5	1,5	0,515	1,210	0,632	1,524
6	1	0	1,5	1,5	0,494	1,055	0,613	1,239
7	1	1	1,5	2,5	0,370	0,743	0,685	1,147
8	1	0	1,5	1,5	0,495	0,850	0,649	1,297
9	0	0,5	1,5	1,5	0,017	0,006	0,048	0,066
10	1	1	1,5	2	0,002	0,012	-0,003	0,090
11	0	1,5	2,5	2,5	0,018	0,008	0,065	-0,042
12	0,5	1	1,5	4	0,041	0,848	1,135	M
13	0,5	2	4	4	0,067	0,105	M	M

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada.

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta

**Tabla 1.9:** Respuesta de la entrada PER-560 de *S. chilense* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

N° Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	1,5	0,5	3	3	0,127	0,479	1,022	1,590
2	1	1,5	2,5	3	0,119	0,402	1,278	1,011
3	1	1	2	2,5	0,071	0,361	1,226	1,151
4	0	1,5	3	3	0,210	0,544	1,165	0,907
5	2	1	1,5	4	0,066	0,442	1,065	M
6	0,5	2	3	4	0,053	0,344	0,989	M
7	0,5	0	1,5	2	-0,004	0,043	0,084	0,023
8	1,5	1	1	1	0,001	0,111	0,017	0,006

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada.

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta

**Tabla 1.10:** Respuesta de la entrada ECU-675 de *S. habrochaites* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	0,5	1,5	1,5	0,110	0,509	0,879	0,457
2	0,5	0,5	0,5	1,5	0,087	0,435	0,892	0,391
3	0,5	0,5	1,5	2,5	0,078	0,512	0,998	0,497
4	1	0,5	1,5	1,5	0,124	0,613	1,026	0,427
5	0	0,5	1	1,5	0,127	0,460	0,749	0,365
6	1,5	1	2	2	0,066	0,541	0,807	0,425
7	0,5	1	1,5	1,5	0,260	0,546	0,931	0,323
8	0,5	0,5	2	1,5	0,148	0,306	0,987	0,436
9	0,5	1	2	2,5	0,240	0,380	0,707	0,354
10	1	1,5	1	1,5	0,309	0,658	0,951	0,537
11	0,5	0	0,5	1,5	0,166	0,672	0,773	0,421
12	1	0	0,5	2	0,207	0,411	0,975	0,385
13	0	0,5	0,5	1	0,277	0,395	1,085	0,439
14	0,5	0,5	2,5	2,5	0,168	0,505	0,925	0,336
15	0	1	1,5	2,5	0,211	0,544	0,860	0,407
16	0,5	0,5	0,5	2	0,232	0,519	0,672	0,527
17	0,5	0,5	0,5	2	0,181	0,424	0,674	0,401
18	0,5	1,5	1,5	2,5	0,087	0,508	1,162	0,451
18	0,5	1,5	1,5	2,5	0,087	0,508	1,162	0,451
19	0,5	1,5	1,5	2	0,103	0,496	0,751	0,429
20	0	0,5	1,5	1,5	0,188	0,429	0,858	0,571
21	0,5	1,5	1,5	2,5	0,236	0,448	0,976	0,356
22	0,5	0,5	1	1,5	0,175	0,454	0,757	0,405
23	0,5	0,5	1	1,5	0,226	0,501	0,853	0,607
24	0	1	1,5	2	0,194	0,500	0,893	0,468
25	0,5	1	1	2	0,104	0,372	0,979	0,369
26	0,5	0,5	0,5	1,5	0,149	0,455	0,836	0,571
27	0	0,5	1	1,5	0,188	0,417	0,834	0,356
28	0,5	0,5	2	2,5	0,208	0,457	0,900	0,405
29	0,5	0,5	2	3	0,255	0,481	1,244	0,607
30	1	1	2,5	2,5	0,154	0,506	1,003	0,468
31	0	0,5	0,5	2	0,295	0,650	1,089	0,589

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación

**Tabla 1.11:** Respuesta de la entrada ECU-764 de *S. habrochaites* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	0	0	0	1,467	0,810	1,926	1,839
2	0	0	0	0	1,324	0,685	1,936	1,772
3	0,5	0	0	0	1,114	0,568	1,926	1,733
4	0,5	0	0	0	1,355	0,692	1,935	1,729
5	0,5	0	0	0	1,522	0,562	1,874	1,765
6	0,5	0	0	0	1,494	0,679	1,927	1,750
7	0,5	0	0	0	1,468	0,786	1,932	1,634
8	0,5	0	0	0	1,142	0,657	1,956	1,631
9	0,5	0	0	0	1,176	0,460	1,927	1,763

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación

**Tabla 1.12:** Respuesta de la entrada ECU-888 de *S. habrochaites* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0,5	0,5	0,5	1,5	0,112	0,299	0,862	0,959
2	0	0,5	2	2	0,194	0,514	0,619	0,828
3	0,5	0,5	2	2	0,093	0,424	0,763	0,720
4	0,5	0,5	2	2	0,140	0,401	0,765	0,823
5	0,5	0,5	0,5	2	0,217	0,422	0,588	0,800
6	0,5	2	2	2	0,689	0,647	0,752	1,026

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación

**Tabla 1.12 (continuación):** Respuesta de la entrada ECU-888 de *S. habrochaites* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
7	0	2	2	2	0,757	0,752	0,805	1,150
8	0,5	1,5	2	2,5	0,560	0,536	0,788	1,115
9	0,5	0,5	1,5	2,5	0,501	0,612	0,608	1,112
10	0,5	2	2	2	0,479	0,592	0,665	1,129
11	0	1,5	2	2	0,630	0,440	0,705	1,121
12	0,5	0,5	1,5	2	0,606	0,591	0,625	1,179

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación

**Tabla 1.13:** Respuesta de la entrada ECU-911 de *S. habrochaites* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	1	1	1	0,785	0,161	0,265	0,955
2	1	1	1	2	0,101	0,449	0,695	0,540
3	1	1	1	2	0,924	0,194	0,480	0,813
4	0	1	1	2	-0,003	0,060	0,844	0,980
5	1	1	1	2	0,179	0,645	0,990	1,027
6	1	1	1	1	0,563	0,074	0,507	0,762
7	0	0	1	1	1,576	0,517	0,045	0,346
8	0	1	1	0	1,813	0,735	0,111	0,345
9	2	2	1	2	1,966	0,734	0,084	0,376
10	0	2	1	2	1,915	0,620	0,136	0,436
11	0,5	1	1	0,5	2,068	0,635	0,140	0,439
12	0	1	0,5	1	1,907	0,540	0,088	0,386
13	0,5	0,5	0	0,5	1,927	0,790	0,068	0,364
14	1,5	1,5	1	1	1,914	0,682	0,104	0,321
15	0	0	0,5	1	2,095	0,776	0,057	0,417
16	0	0,5	0,5	0,5	2,062	0,610	0,138	0,525
17	0,5	0,5	0,5	0,5	1,892	0,706	0,059	0,377
18	0	0,5	0,5	0,5	1,976	0,739	0,066	0,391
19	0,5	0,5	1	1	2,017	0,777	0,105	0,267
20	1,5	1	1,5	4	0,152	0,179	1,055	M
21	0,5	0,5	2	2,5	0,087	0,412	0,762	0,669
22	1	0,5	1	2	0,116	0,638	0,659	0,670
23	1	0,5	1	2	0,090	0,510	0,936	0,843
24	0,5	1	2	2	0,057	0,429	0,730	0,547
25	0	0,5	1,5	2	0,081	0,457	1,128	0,577
26	1,5	1	1	1	0,161	0,382	1,055	0,725
27	0,5	1	1,5	2,5	0,202	1,041	1,125	0,821
28	0	0	1,5	1,5	0,021	0,054	0,764	0,644
29	1	0,5	1	2,5	0,076	0,400	0,722	0,828
30	2	2,5	3	4	0,557	1,282	1,004	M
31	1	0,5	1,5	0,5	0,040	0,479	0,696	0,676
32	0	1,5	3	3	0,183	0,579	1,048	0,848
33	0,5	0,5	2	2	-0,023	0,397	0,856	0,641
34	0,5	0,5	2	2	0,031	0,366	0,758	0,618
35	0,5	2,5	2,5	4	0,632	1,082	0,712	M
36	0,5	0,5	1	2	0,031	0,261	0,572	0,714
37	0	0,5	1	2	0,134	0,596	0,392	0,982
38	0,5	0,5	1,5	2	0,061	0,382	1,108	0,710
39	0,5	0,5	1,5	2	0,081	0,407	1,043	0,631
40	0,5	0,5	1	2	0,122	0,353	0,878	0,895
41	0,5	0,5	0,5	1	0,037	0,413	0,858	0,503
42	0	0,5	1	2	0,134	0,618	1,182	0,695
43	0,5	0,5	1,5	2,5	0,061	0,504	0,702	0,907
44	0	0,5	1,5	2	0,234	0,592	0,863	0,472
45	0,5	0,5	1,5	1	0,105	0,523	0,777	0,548
46	0,5	1,5	2	1,5	0,080	0,400	1,185	0,456
47	1	2	2,5	2,5	0,080	0,525	0,747	1,018
48	0	0,5	2	2	0,148	0,531	1,049	0,606
49	0,5	0,5	2,5	2	0,134	0,625	0,845	0,627
50	1,5	1	1,5	1,5	0,126	0,052	0,989	0,554
51	0,5	1,5	2,5	3	0,002	0,086	1,221	0,977
52	0	4	4	4	0,203	M	M	M

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

**Tabla 1.14** Respuesta de la entrada ECU-926 de *S. habrochaites* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0,5	0	0,5	0,5	1,890	0,716	0,357	0,528
2	0	0	0,5	1	1,764	0,367	0,059	0,446
3	0	0,5	0,5	0,5	1,650	0,450	0,070	0,414
4	0,5	0	0,5	1	1,927	0,418	0,119	0,421
5	0	0	0,5	1,5	2,149	0,564	0,098	0,497
6	0	0,5	0,5	1	1,846	0,448	0,104	0,551
7	0	0,5	0,5	0,5	2,026	0,477	0,050	0,339
8	0	0	0,5	1	2,175	0,571	0,078	0,631
9	0	0	0,5	0,5	1,918	0,512	0,105	0,497
10	0	0	0,5	0,5	2,258	0,549	0,064	0,326
11	0,5	0	0,5	0,5	1,796	0,628	0,101	0,342
12	0,5	0	0	0,5	1,810	0,443	0,108	0,467
13	0	0,5	0,5	0,5	1,927	0,622	0,064	0,372
14	0,5	0	1	0,5	2,091	0,605	0,036	0,454
15	0	0	2,5	2,5	0,151	0,426	0,694	0,670
16	0	0,5	0	2,5	0,127	0,537	0,445	0,593
17	0	1,5	1,5	2	0,099	0,462	0,798	0,573
18	0	1	1	2	0,158	0,390	0,562	0,684
19	0,5	0,5	1	2	0,104	0,379	0,579	0,954
20	0,5	0,5	1	2	0,108	0,365	0,508	0,740
21	0	0,5	1	2	0,120	0,430	0,804	0,707
22	0	1	1,5	2	0,194	0,495	0,566	0,440
23	0	0,5	0,5	1	0,102	0,319	0,821	1,109
24	1	0,5	1	2	0,126	0,361	0,699	0,605
25	1	0,5	1	2,5	0,089	0,477	0,655	0,728
26	0,5	1	1,5	0,5	0,103	0,345	0,670	0,666
27	0,5	1	1,5	2	0,245	0,370	0,764	0,613
28	0,5	1	1,5	2,5	0,152	0,432	0,961	0,595
29	0	0,5	1	2,5	0,203	0,448	0,475	0,764

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

**Tabla 1.15:** Respuesta de la entrada ECU-968 de *S. habrochaites* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	0	0,5	1	0,754	0,181	0,465	1,046
2	0	0	0	1	0,464	0,094	0,386	0,845
3	0,5	0,5	0	1,5	0,755	0,116	0,332	0,883
4	0,5	0	0,5	1	0,626	0,034	0,256	0,911
5	0	0	0	1	0,900	0,010	0,315	0,695
6	0,5	0,5	0,5	1	0,576	0,067	0,344	0,938
7	0	0,5	0,5	1	0,769	0,124	0,291	0,769
8	0	0	0,5	0,5	0,040	0,102	0,452	0,716
9	0	0	0	3,5	0,054	0,010	0,046	1,203
10	0	0,5	0,5	3	0,232	0,023	0,449	0,896
11	0	0,5	0,5	1,5	0,003	0,011	0,052	0,169
12	0,5	0,5	1	1	0,721	0,081	0,449	0,931
13	1	1	0,5	1	0,030	0,006	0,065	1,195
14	0,5	0,5	0,5	2,5	0,041	0,026	0,204	0,766
15	0,5	0	0,5	0,5	0,006	0,021	0,118	0,202
16	0,5	0,5	0,5	1	0,584	0,134	0,325	0,811
17	0,5	0,5	0,5	1	0,011	0,094	0,339	0,841
18	0,5	0,5	1,5	2,5	0,578	0,213	0,482	0,862
19	0	0	0,5	1,5	0,412	0,092	0,492	1,254
20	0,5	0	0,5	1,5	0,533	0,102	0,331	0,885
21	1	0	0,5	1,5	0,685	0,086	0,364	0,641
22	0,5	0	0	1	0,060	0,070	0,295	0,816
23	0	0	0,5	2	0,006	0,012	0,036	0,220
24	0	1	1	1,5	0,077	0,271	0,900	0,533
25	0,5	0,5	1	2	0,148	0,424	0,942	0,536
26	0	0	4	4	0,137	0,327	M	M
27	0,5	1	1,5	1,5	0,073	0,194	0,093	1,003
28	0,5	1,5	1,5	1,5	0,408	0,428	0,347	0,840

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

M: Planta muerta.

**Tabla 1.15 (continuación):** Respuesta de la entrada ECU-968 de *S. habrochaites* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

N° Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
29	0,5	2	2	2	0,529	0,568	0,219	0,782
30	0,5	1,5	1,5	1,5	0,443	0,717	0,478	0,962
31	0,5	3,5	3	4	0,312	0,705	0,712	M
32	0,5	1	1,5	4	0,347	0,500	0,916	M
33	0	1	1	1	0,416	0,793	0,655	1,164

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta.

**Tabla 1.16:** Respuesta de la entrada CH-42-5 de *S. lycopersicoides* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

N° Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	0,5	0	1,5	0,160	0,136	0,013	0,122
2	0	0,5	0	0,5	1,502	0,269	0,035	0,252
3	0	0	0	1	1,387	0,414	0,076	1,246
4	0	0	0	0	1,747	0,455	0,537	1,501
5	0	0	0,5	0,5	1,761	0,255	0,957	1,272

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

**Tabla 1.17:** Respuesta de la entrada CH-50/1 de *S. lycopersicoides* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

N° Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	0	0	0	-0,024	0,001	0,106	0,017
2	0	0	0,5	1,5	-0,01	-0,004	0,073	0,020
3	0	0	0	0	1,169	0,748	0,114	0,018
4	0	0,5	0,5	0,5	1,181	0,548	0,072	0,013
5	0	0	0	0	1,065	1,623	0,422	0,025
6	0	0,5	1	0	0,047	0,158	0,143	0,019
7	0	0	0,5	0	-0,003	0,043	0,144	0,017
8	0	0,5	1	0,5	0,026	0,078	0,132	0,501
9	0	0	0	0	0,198	1,234	0,480	0,058
10	0	0	0	0	0,002	0,084	0,164	0,015
11	0	0	0	0	-0,018	0,044	0,168	0,025
12	0	0	0	0	0,062	0,033	0,180	0,023
13	0	0,5	0	0	-0,017	0,013	0,121	0,038
14	0	0	0	0	0,029	0,023	0,180	0,028

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

**Tabla 1.18:** Respuesta de la entrada CH-51/1 de *S. lycopersicoides* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

N° Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0	0	0	0	0,010	0,034	0,054	-0,018
2	0	0	0	0	0,006	0,034	0,071	-0,033
3	0	0	0	0	-0,012	0,038	0,065	-0,033
4	0	0,5	0,5	0	1,234	1,216	0,378	0,659
5	0	0,5	0,5	0,5	0,061	0,202	0,065	-0,012
6	0	0	0,5	0,5	-0,003	0,085	0,039	-0,008
7	0	0,5	0	0	1,354	1,791	0,344	0,13
8	0	0	0,5	0,5	0,827	0,762	0,033	-0,031
9	0	0	0	0,5	-0,019	0,161	0,078	-0,018

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

**Tabla 1.18 (continuación):** Respuesta de la entrada CH-51/1 de *S. lycopersicoides* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
10	0	0	0,5	0,5	-0,014	1,303	0,495	0,778
11	0	0	0,5	0,5	0,029	0,219	0,097	-0,018
12	0	0	1	1	-0,006	1,227	0,262	0,111
13	0	0	0,5	0	0,050	0,465	0,058	-0,011
14	0	0	0	0	-0,019	0,110	0,134	-0,012
15	0	0	0	0	-0,013	0,084	0,144	0,036
16	0	0	0	0	-0,010	0,088	0,149	-0,015
17	0	0,5	0,5	1	0,338	1,124	0,501	-0,016
18	0	0	0	1,5	0,026	0,090	0,114	-0,033
19	0	0	0	0	-0,029	0,043	0,023	-0,029
20	0	0	0	0,5	0,017	0,054	0,103	-0,022
21	0	0	0	0	-0,013	0,056	0,147	-0,014
22	0,5	0	0	0,5	1,142	1,720	0,408	0,932

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

**Tabla 1.19:** Respuesta de la entrada CH-22/2 de *S. peruvianum* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	1	1	0,5	0,5	1,071	1,044	0,374	0,015
2	0,5	0,5	0	0,5	1,222	0,997	0,404	0,993
3	1	1	0,5	1	1,252	1,111	0,435	0,752
4	0,5	0,5	0,5	1	1,217	1,053	0,299	0,990
5	1	0,5	0,5	0,5	1,165	0,943	0,388	0,338
6	1	0,5	0,5	0,5	1,080	0,737	0,550	0,135
7	1	1	0,5	0,5	1,062	1,183	0,454	0,077
8	1	0,5	1	1	1,134	1,308	0,323	0,947
9	1	0	0	0,5	1,219	1,222	0,293	0,751
10	1	0	1	0,5	1,136	1,159	0,181	0,778
11	1	1	0,5	1	1,035	1,193	0,149	0,521
12	0	0,5	0,5	0,5	0,935	1,220	0,381	0,183
13	0,5	1	0,5	0,5	1,255	1,151	0,362	0,099
14	1	1	1	0,5	1,165	1,272	0,298	0,745
15	0	1,5	1	1,5	1,174	1,289	0,355	0,783
16	0	0,5	0,5	1	1,004	1,314	0,232	0,254
17	0,5	0,5	0,5	1	1,215	1,307	0,455	0,178
18	1	1	1,5	4	1,348	0,354	1,202	1,134
19	0,5	1	0,5	1	0,309	0,809	1,344	1,675
20	0,5	0,5	0,5	0,5	0,355	0,822	1,221	1,644
21	0,5	0,5	1	1	1,440	0,315	0,233	1,117
22	1	3	1	1	0,251	0,052	1,117	1,117

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

**Tabla 1.20:** Respuesta de la entrada ECU-944 de *S. peruvianum* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	1,5	1,5	3,5	3,5	0,083	0,514	0,688	0,769
2	1	2	3,5	3	0,184	0,493	0,781	0,909
3	2	1	3,5	3,5	0,104	0,574	0,800	0,741
4	1	1,5	3	2,5	0,191	0,567	0,834	1,104
5	0,5	4	4	4	0,109	M	M	M
6	1	1,5	2	2,5	0,078	0,540	0,776	0,835

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta.

**Tabla 1.21:** Respuesta de la entrada ECU-953 de *S. peruvianum* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	2,5	0,5	4	4	0,601	1,210	M	M
2	2,5	3	2,5	2,5	0,435	0,901	1,329	0,943
3	2,5	2,5	2,5	2,5	0,374	0,915	1,287	0,931
4	2	3	3	3	0,458	0,951	1,084	0,859
5	2,5	3,5	3	3	0,416	0,971	1,181	0,973
6	2	2,5	2,5	4	0,423	0,884	1,345	M
7	2,5	3	2,5	2,5	0,744	0,714	1,303	0,899
8	2,5	3	2,5	2,5	0,412	0,855	1,288	1,105
9	2	2,5	2,5	3	0,380	0,836	1,267	0,996
10	2	2,5	2	2	0,442	0,998	1,168	0,853
11	2	3	1,5	1,5	0,557	0,854	1,243	0,792
12	2,5	3	2,5	2,5	0,684	0,872	1,388	1,016
13	2,5	3	3	2,5	0,589	0,865	1,289	0,926
14	2	3	2,5	2,5	0,445	0,687	1,216	1,023
15	2,5	3,5	3	3	0,022	0,643	0,949	0,452
16	2,5	2,5	2,5	2,5	0,460	0,978	1,184	1,029
17	2,5	3	4	4	0,018	0,039	M	M
18	2,5	2,5	2,5	2,5	0,597	0,789	1,239	0,875
19	2	2,5	3	3	0,641	0,766	1,198	1,259
20	2	2,5	2,5	2,5	0,547	0,679	1,195	1,031
21	1,5	2,5	2,5	2,5	0,441	0,890	1,251	0,969
22	2	2,5	2,5	3	0,673	0,806	1,359	1,091
23	1,5	2,5	2,5	4	0,623	0,785	1,251	M
24	2	2	3	4	0,130	0,656	0,905	M
25	1,5	2,5	3	2,5	0,105	0,716	0,761	1,116
26	1	2	2,5	2,5	0,104	0,566	0,779	1,116
27	1	2	2,5	3	0,082	0,645	0,865	1,232
28	1,5	2	0,5	4	0,086	0,591	0,910	M
29	1,5	2	3	3	0,121	0,572	0,953	1,210
30	1	2	3	3	0,103	0,650	0,926	1,203
31	1	2	3	3	0,115	0,635	0,706	0,961

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta.

**Tabla 1.22:** Respuesta de la entrada ECU-877 de *S. pimpinellifolium* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	1,5	2	1,5	1,5	0,476	1,003	0,794	1,082
2	0,5	1,5	1,5	1,5	0,062	1,050	0,743	1,344
3	0,5	0,5	1	1,5	0,427	1,354	0,930	1,046
4	1,5	2	2	1,5	0,460	0,963	0,808	1,210

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

**Tabla 1.23:** Respuesta de la entrada ECU-878 de *S. pimpinellifolium* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SÍNTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	1,5	2	2	2	0,090	0,375	1,106	0,618
2	1	1	1	1,5	0,159	0,701	1,009	0,747
3	1,5	1,5	1,5	2,5	0,141	0,492	1,060	0,940
4	1	1,5	2,5	3	0,115	0,507	1,155	0,748
5	2	2	2,5	2,5	0,004	0,063	0,208	0,139
6	2,5	2,5	2,5	3	0,184	0,547	1,054	0,549
7	1,5	1	1	2	0,104	0,539	1,131	0,634
8	0,5	1	4	4	0,062	0,730	M	M
9	0,5	1	2	2	0,119	0,357	0,981	0,655

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta.

**Tabla 1.23 (continuación):** Respuesta de la entrada ECU-878 de *S. pimpinellifolium* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SINTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
10	0,5	1	1,5	2	0,089	0,354	1,146	0,629
11	0	1	1	1,5	0,395	1,497	0,717	0,786
12	1	1,5	2	2	0,696	0,846	0,638	0,785
13	1	2	2	2,5	0,410	0,644	0,541	0,592
14	2	1	1	4	0,474	0,671	0,694	M
15	1	4	4	4	0,690	M	M	M
16	1	2,5	2,5	2	0,442	0,886	0,638	0,740
17	1,5	2	2	2	0,622	0,897	0,582	0,818
18	1	1,5	2	2	0,492	0,789	0,678	0,960
19	1	1	1,5	2	0,400	0,625	0,593	0,685
20	0,5	2,5	2,5	3	0,393	0,754	0,862	0,737
21	0,5	1	2	2,5	0,482	0,753	0,486	0,661
22	0,5	1	1,5	1,5	0,507	0,766	0,729	0,803
23	2	2	2	2	0,607	0,783	0,527	0,708
24	0,5	1,5	1,5	1,5	0,427	0,667	0,444	0,990
25	1	1,5	2	2	0,437	0,563	0,518	0,840
26	1,5	2	2	2,5	0,526	0,595	0,453	0,741
27	1	2,5	2,5	2	0,463	0,684	0,559	0,891

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta.

**Tabla 1.24:** Respuesta de la entrada ECU-966 de *S. pimpinellifolium* frente a la inoculación mecánica con el aislado LE-2002 de PepMV.

Nº Planta	SINTOMAS <sup>1</sup>				DAS ELISA <sup>2</sup>			
	15 <sup>3</sup>	30	45	60	15	30	45	60
1	0,5	1,5	2	2	0,068	0,554	1,143	0,618
2	0,5	1	2	2	0,071	0,551	0,951	0,549
3	0,5	1	2,5	2,5	0,065	0,473	0,976	0,657
4	2	2	3	3	0,126	0,518	1,162	0,749
5	1	2	1	2	0,075	0,437	1,280	0,736
6	2	2	2,5	2,5	0,170	0,547	1,201	0,680
7	0,5	1	2	3	0,057	0,373	1,152	0,640
8	1	1	1,5	2	0,069	0,480	1,091	0,561
9	1	1,5	2	2	0,511	0,916	0,559	1,229
10	1,5	1,5	2,5	2,5	0,509	1,079	0,658	0,888
11	2	2	2,5	3	0,502	1,196	0,687	1,424
12	1,5	3	3	3	0,075	0,095	0,038	1,126
13	1,5	1,5	1,5	1,5	0,397	1,197	0,567	1,123
14	2,5	3	3	3	0,038	0,059	0,135	0,348
15	2	2	4	4	0,082	0,207	M	M
16	1,5	2,5	2,5	2,5	0,164	1,798	0,565	1,016
17	0,5	2	2,5	2,5	0,411	1,081	0,607	1,067
18	0,5	2	2,5	2,5	0,528	0,966	0,463	1,157
19	1	2,5	2,5	2	0,557	0,804	0,536	1,154
20	1	2,5	2,5	2	0,466	0,974	0,690	1,207
21	0,5	1,5	2	2	0,494	1,020	0,568	1,154
22	0,5	2	2	2	0,483	1,054	0,563	1,127
23	0,5	2	2	1,5	0,372	1,051	0,513	1,169
24	1	1,5	2	2	0,038	1,077	0,585	1,079
25	1	2	2,5	3	0,518	0,968	0,642	0,965
26	0,5	2	2	3	0,473	0,335	0,633	0,794

1: Índice de síntomas medido en una escala de 0 a 4 (0, sin síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas graves; 4, síntomas muy graves o planta muerta).

2: Valor de la absorbancia de de la reacción serológica DAS-ELISA para cada una de las plantas probadas de cada entrada..

3: Días después de la 2ª inoculación.

M:Planta muerta.

**Tabla 1.25:** Tabla de seguimiento, síntomas y absorbancias de las plantas seleccionadas a los 90 DDI.

ENTRADA	SÍNTOMAS	DAS-ELISA
	90 DDI	90 DDI
<i>S. chilense</i>		
LA-1971 20	0	0,024
LA-1971 31	0,5	0,010
PER-560 7	2	-0,043
PER-560 8	2	0,080
PER-527 9	1	0,001
PER-527 10	3	1,740
PER-527 11	2	-0,030
CH-62/5 1	0,5	0,029
CH-62/5 2	0,5	0,027
CH-62/5 15	0,5	0,049
<i>S. lycopersicoides</i>		
CH-51/1 1	2	0,658
CH-51/1 2	0	0,017
CH-51/1 3	3	0,529
CH-51/1 15	2,5	0,303
CH-51/1 16	0	0,032
CH-50/1 1	2	0,834